



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**CITOLOGIA E INFECÇÃO PELO HPV EM OROFARINGE DE
PACIENTES HIV-POSITIVO**

LEONORA MACIEL DE SOUZA VIANNA

**BRASÍLIA-DF
2015**

LEONORA MACIEL DE SOUZA VIANNA

**CITOLOGIA E INFECÇÃO PELO HPV EM OROFARINGE DE
PACIENTES HIV-POSITIVOS – UM ESTUDO MORFOLÓGICO E
MOLECULAR**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: **Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro**

Co-orientadora: **Prof. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca**

**BRASÍLIA-DF
2015**

LEONORA MACIEL DE SOUZA VIANNA

**CITOLOGIA E INFECÇÃO PELO HPV EM OROFARINGE DE
PACIENTES HIV-POSITIVOS – UM ESTUDO MORFOLÓGICO E
MOLECULAR**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: **Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro**

Co-orientadora: **Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca**

Aprovada em 31 de agosto de 2015

BANCA EXAMINADORA

Fabiana Pirani Carneiro – (Presidente)
Universidade de Brasília – UnB

Rivadávio Fernandes Batista Amorim – (Examinador interno)
Universidade de Brasília – UnB

Albino Verçosa de Magalhães – (Examinador interno)
Universidade de Brasília – UnB

Cleudson Nery de Castro- (Examinador interno)
Universidade de Brasília - UnB

Rosângela Vieira Andrade – (Examinador externo)
Universidade Católica de Brasília – UCB

Andrea Barreto Motoyama – (Suplente)
Universidade de Brasília – UnB

*Dedico este trabalho a Sophie, fonte constante de
alegria para toda a nossa família!*

AGRADECIMENTOS

- À Professora Fabiana Pirani Carneiro, presente em todos os momentos fáceis e difíceis deste trabalho. Sua simplicidade, praticidade e competência são qualidades valiosas! Na vida tenho encontrado poucas pessoas como você...
- Aos professores, colegas e funcionários do Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário de Brasília, por todo o auxílio que nos deram durante a realização desse trabalho.
- À Tércia Maria Mendes L. de Castro que executou a coloração imunocitoquímica desse trabalho.
- Aos professores, colegas e funcionários do Laboratório de Histopatologia Bucal do Departamento de Odontologia, da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília (FS-UnB), em particular a professora Eliete Neves da Silva, por todo o auxílio que nos deram durante a realização desse trabalho.
- Ao técnico Alexandre Palermo do Laboratório de Histopatologia Bucal do Departamento de Odontologia, da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, pela colaboração constante no desenvolvimento da análise molecular.
- À Profa. Anamélia Lorenzetti Bocca pelo auxílio na realização da captura híbrida.
- À Profa. Andréa Motoyama pela disponibilidade constante em todos os momentos requisitados.
- À Profa. Vânia Ferreira pela disponibilidade constante e pela grande ajuda na formatação deste trabalho.

- Aos colegas e técnicos do Centro de Anatomia Patológica, pela colaboração constante.
- Aos pacientes que permitiram a realização desse trabalho, pela paciência, e confiança em nos depositar tantos momentos íntimos de suas vidas.
- Ao Laboratório MICRA, em particular ao Dr. Teodoro Ostrowski pela execução das lâminas para a análise em meio líquido.
- À Fundação de Auxílio à Pesquisa do Distrito Federal, pelo apoio financeiro à essa pesquisa.
- Aos meus pais, *in memorium*, pelo bom alicerce que me deram.
- E, finalmente, aos meus filhos queridos, pelo apoio, carinho e incentivo constantes.

“Jamais aceite como verdadeira coisa alguma que você não conheça a evidência. Divida cada dificuldade a ser examinada em tantas partes quanto possível e necessário para resolvê-las. Ponha em ordem seus pensamentos, começando pelos assuntos mais simples e mais fáceis de serem conhecidos, para atingir, paulatinamente, gradativamente, o conhecimento dos mais complexos e supondo ainda uma ordem entre os que não se precedem normalmente uns aos outros. Para cada caso enumere revisões exatas e gerais para não esquecer nada”.

(Discurso Sobre o Método, René Descartes)

RESUMO

A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana, tem comportamento pandêmico, sendo um problema de saúde pública. Considerando que pacientes com SIDA têm maior chance de desenvolver neoplasias e que a imunodeficiência poderia facilitar a permanência do Papiloma vírus (HPV) em orofaringe destes pacientes, o objetivo deste trabalho foi pesquisar a infecção pelo HPV e lesões a ele relacionadas em orofaringe de paciente HIV positivos. Foram avaliados 100 pacientes atendidos no ambulatório de DIP/SIDA do HUB. Os dados demográficos, clínicos, hábitos e perfil sócio comportamental foram avaliados por meio de um questionário estruturado. A coleta para a análise citológica (citologia convencional, em meio líquido e imunocitoquímica) e molecular (captura híbrida e PCR) foi feita em orofaringe com escovas. Para as análises citológicas utilizou-se os critérios de Bethesda. A imunocitoquímica avaliou a expressão da proteína p16INK4. A captura híbrida pesquisou o DNA-HPV de alto e baixo risco. A verificação do DNA do HPV pelo PCR utilizou o primer GP5+/6+. Os HPVs de alto e baixo risco foram detectados em 8,2% e 16,7% das amostras respectivamente. A média±dp (máximo-mínimo) da relação RLU/CO (estimativa da carga viral) para os HPVs de alto risco e baixo risco foi, respectivamente, 2,9±2,58 (1,09 - 7,87) e 1,61±0,65 (1,07 - 2,68). Houve positividade para HPV de alto e baixo risco na mesma amostra em dois casos. Não houve diferença significativa quanto a frequência de HPV em relação ao gênero e aos grupos etários. A incidência de HPV foi maior em pacientes heterossexuais (7%) porém ela só foi significativa em mulheres heterossexuais. Nenhuma mulher homossexual foi HPV-positiva e não houve mulheres bissexuais na presente amostra. Não fumantes tiveram 10,6 vezes mais chances de ter HPV. Quanto maior foi a contagem de CD4+ maior a chance dos pacientes apresentarem HPV de baixo risco. Pacientes que não consumiam álcool tiveram quase 15 vezes maior risco de apresentar HPV de baixo risco. Pacientes com menos de um parceiro por ano apresentaram associação ($p \leq 0,003$) com o HPV. Não houve associação entre a infecção oral pelo HPV e a presença de lesão oral, uso de terapia antirretroviral, maconha, outras drogas, coitos oral e anal, uso de preservativo e doenças sexualmente transmissíveis (DST). A citologia convencional não mostrou lesões displásicas, observando-se a presença de atipias de significado indeterminado (ASC-US) em 2 amostras. A presença de atipias citológicas na citologia convencional mostra que o exame citológico pode ser um método eficiente para detectar lesões iniciais em orofaringe, podendo a captura híbrida ser utilizada para detectar a presença do HPV, da mesma forma como é utilizada no colo uterino.

Palavras-chave: HPV, HIV, câncer oral, captura híbrida, PCR, citologia.

ABSTRACT

The AIDS infection caused by the human immunodeficiency virus have a pandemic behavior and has become a public health problem. Considering that AIDS patients are more likely to develop cancer and that immune deficiency could facilitate HPV permanence in the oropharyngeal of these patients, the objective of this study was to investigate HPV infection and related injuries with in HIV-positive in oropharynx. We evaluated 100 patients treated at outpatient DIP/AIDS HUB. The demographic, clinical and behavioral partners habits profile were assessed using a structured questionnaire. The collect for cytological (conventional cytology, immunocytochemistry and base liquid) and molecular (PCR and hybrid capture) analysis were performed in oropharynx with brushes. For cytological analysis the Bethesda's criteria had been used. Immunocytochemistry assessed the expression of the p16INK4 protein. The hybrid capture researched the high HPV DNA and low risk. Verification of DNA in 100 samples was performed using the primer GP5⁺/6⁺. HPV high and low risk were detected in 8.2% and 16.7% of the samples respectively. Those with high-risk and low-risk HPV, the mean \pm SD (high-low) of the relationship RLU / CO (estimate viral load) was respectively 2.9 ± 2.58 (1.09 to 7.87) and 1.61 ± 0.65 (1.07 to 2.68). There were positive for HPV high and low risk in the same sample in two cases. There was no significant difference in the frequency of HPV in relation to gender and age group. The incidence of HPV was larger in heterosexual patients (7%) but there were significant only in heterosexual women. No homosexual women was HPV-positive and there was no bisexual women in this sample. No smokers had 10.6 times more chance to have HPV. The higher the CD4⁺ count greater the chance of patients have low-risk HPV. Patients who did not consume alcohol were almost 15 times higher risk of having low-risk HPV. Patients with less than one partner per year were associated ($p \leq 0.003$) with HPV. There was no association between oral HPV infection and the presence of oral lesion, use of antiretroviral therapy, marijuana, other drugs, oral and anal intercourse, condom use and STDs. The conventional cytology showed no dysplastic lesions but observed the presence of atypical cells of undetermined significance (ASC-US) in 2 samples. Cytologic atypias features in conventional cytology reveals that cytological examination can be an efficient method to detect early lesions in the oropharynx and hybrid capture can be used to detect the presence of HPV in the same manner as used in the cervix.

Keywords: HPV, HIV, oral cancer, hybrid capture, PCR, cytology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Lesões orais causadas pelo HPV	20
Figura 2 – Aspectos citológicos e histológicos	21
Figura 3 – Árvore filogenética do gênero alfa-papilomavírus	24
Figura 4 – Mapa genético do HPV 16.....	25
Figura 5 – Interação do vírus com as células do epitélio pavimentoso.....	26
Figura 6 – Representação esquemática das alterações morfológicas que ocorrem no epitélio estratificado decorrente da ação do HPV.....	27
Figura 7 – Infecção pelo HPV no epitélio pavimentoso estratificado	28
Figura 8 – Representação esquemática mostrando o efeito das proteínas virais na progressão da lesão.....	32
Figura 9 – Corte histológicos mostrando a progressão neoplásica no epitélio pavimentoso estratificado.....	33
Figura 10 – ASC-US.....	58
Figura 11 – Alterações inflamatórias	59
Figura 12 – Flora.	60
Figura 13 – Alterações celulares causadas pela <i>Cândida sp.</i>	61
Figura 14 – Padrão eletroforético do DNA amplificado do gene da β -globina obtido após PCR.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquema relacionando a função dos diferentes genes do HPV	31
Tabela 2 - Sequência gênica dos primers Forward (F) e Reverse (R) para detectar a β globina.....	50
Tabela 3 – Sequência de primers usados para detectar o HPV	51
Tabela 4 – Distribuição de frequência das variáveis clínicas na população estudada	54/55
Tabela 5 – Relação entre lesão oral evidente e coito oral	55
Tabela 6 – Relação entre lesão oral evidente e CD4 ⁺	56
Tabela 7 – Resultados dos exames citológicos pelos métodos da citologia convencional e meio líquido segundo os observadores	57/58
Tabela 8 – Estudo Molecular – PCR e Captura Hybrida. Valores da RLU/CO obtidos na captura híbrida para HPV de alto e baixo risco	62/63
Tabela 9 – Análise estatística da associação entre o HPV, HPV de alto risco e HPV de baixo risco com as variáveis clínicas estudadas	65/66/67
Tabela 10 – Análise de regressão logística do novo modelo com a variável resposta HPV após ajustamento por seleção de variáveis por metodologia Backward Stepwise (Razão de Verossimilhança)	68
Tabela 11 – Análise de regressão logística da variável resposta HPV Baixo Risco após ajustamento por seleção de variáveis por metodologia Backward Stepwise (Razão de Verossimilhança)	69
Tabela 12 – Análise de regressão logística da variável resposta HPV Alto Risco após ajustamento por seleção de variáveis por metodologia Backward Stepwise (Razão de Verossimilhança).....	69
Tabela 13 – Tabela de contingência mostrando uma correlação entre a opção sexual, o sexo e a infecção pelo HPV	70

Tabela 14 – Tabela de contingência correlacionando os resultados do exame citológico com o HPV e HPV de alto e baixo risco	71
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.....	Absorbância
ASC-H.....	Do inglês Atypical Squamous Cell – cannot exclude HSIL – (Células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau)
ASC-US.....	Do inglês Atypical Squamous Cell - cannot Undetermined Significance HSIL (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)
β-globina	Beta globina
C.....	Centígrado
CCEOR.....	Carcinoma de Células Escamosas de Orofaringe
CA	Coito anal
CEC.....	Carcinoma de Células Escamosas
CEP-FM.....	Comitê de Ética em Pesquisa – Faculdade de Medicina
CO	Coito oral
DAB.....	Diaminobenzidina
DH ₂ O	Água destilada
DIP	Doenças Infecciosas e Parasitárias
DNA.....	Ácido Desoxinucleico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
<i>EGFR</i>	Fator de Crescimento Epidérmico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	Do inglês <i>High Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão intraepitelial escamosa de alto grau)
HUB.....	Hospital Universitário de Brasília
LOE	Lesão oral evidente
LSAB	Estreptoavidina-Biotina-Peroxidase
LSIL.....	Do inglês <i>Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Intra-epitelial escamosa de baixo grau)
NP	Número de parceiros
ORF.....	Do inglês <i>Open Read Frame</i>

OS Opção sexual
p Nível de significância
PCR..... Reação em cadeia da polimerase
PGDF..... Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
RLU/CO..... Unidade Relativa de Luz/cutoff
RNA..... Ácido Ribonucleico
SBC Sociedade Brasileira de Citologia
SIDA..... Síndrome de imunodeficiência adquirida
SPSS..... Do inglês
Statistical Package for Social Sciences (Programa Estatístico para Ciências Sociais
TARV..... Terapia antirretroviral
TBS Solução tampão básica
TCLE Termo de consentimento livre e esclarecido
UCM Universal Medium Collection
UP Uso de preservativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2.REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 CÂNCER DE OROFARINGE	17
2.1.1 Epidemiologia	17
2.1.2 Dados clínicos	17
2.1.3 Métodos diagnósticos	18
2.1.4 Tratamento	20
2.1.5 Prognóstico	20
2.2 HPV	20
2.2.1 Considerações gerais	20
2.2.2 Estrutura e ciclo de vida do HPV	21
2.2.3 Carcinogênese	24
2.2.4 Infecção pelo HPV	30
2.2.5 HPV e HIV	31
2.2.6 Vias de infecção	32
2.2.7 Métodos diagnósticos	34
2.3 HPV E CÂNCER	36
3. JUSTIFICATIVA.....	37
4. OBJETIVOS.....	38
4.1 GERAL	38
4.2 ESPECÍFICOS	38
5. MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1 AMOSTRA DO ESTUDO	40
5.2 EXAME DA CAVIDADE ORAL	40
5.3 EXAME CITOLÓGICO	41
5.3.1 Coleta.....	41
5.3.2 Avaliação citológica.....	42

5.3.3 Imunocitoquímica	43
5.4 EXAME MOLECULAR	44
5.4.1 Captura híbrida	44
5.4.2 Reação em cadeia da polimerase	45
5.4.2.1 Extração do DNA.....	45
5.4.2.2 Quantificação, pureza e rendimento do DNA	47
5.4.2.3 Qualidade do DNA	47
5.4.2.4 Detecção do HPV	48
5.4.2.5 Eletroforese em gel de agarose	49
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5.5.1 Análise de Regressão Logística	49
5.5.1 Análise de associação	50
6. RESULTADOS.....	51
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	51
6.2 RESULTADOS DOS EXAMES CITOLÓGICO E IMUNOCITOQUÍMICO.....	54
6.3 RESULTADOS DA CAPTURA HÍBRIDA.....	60
6.4 RESULTADOS DO PCR	69
6.4.1 Análise Quantitativa do DNA	69
6.4.2 Análise da detecção do Papiloma Vírus Humano	69
7. DISCUSSÃO	72
8. CONCLUSÕES	84
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
10. APÊNDICES	95

1. INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), é uma infecção de comportamento pandêmico e de alta gravidade, representando um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. No Brasil, desde o início da epidemia em 1980 até 2012, já foram notificados aproximadamente 656 mil casos da doença, sendo a taxa de incidência de 20,2 casos por 100 mil habitantes. A maior taxa de incidência é na região Sul (30,9 casos/100mil habitantes) vindo em ordem decrescente as regiões Sudeste (21 casos/100mil habitantes), Norte (20,8 casos/100mil habitantes), Centro-oeste (17,5 casos/100mil habitantes) e Nordeste (13,9 casos/100mil habitantes). O maior número de casos acumulados está na região Sudeste (56%) (<http://www.aids.gov.br>).

O desenvolvimento da terapia antirretroviral e a melhora na prevenção e tratamento das infecções oportunistas levou a uma queda da mortalidade e a um aumento da sobrevida. Com isto houve um aumento da incidência de câncer nesses pacientes, motivo pelo qual estratégias de prevenção, rastreamento e tratamento se tornaram importantes áreas de pesquisa (Bonnet, 2004). As neoplasias que acometem os pacientes com SIDA estão relacionadas principalmente com três tipos de vírus: herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi, vírus Epstein-Barr e papilomavírus humano (HPV) (Bernstein et al, 2006).

A infecção pelo HPV está ligada, principalmente, a carcinogênese dos tumores de colo uterino, porém atualmente sabe-se que ela também desempenha um papel importante na etiologia do câncer de orofaringe e anogenital (Parkin, 2006; Trottier, 2006). Considerando-se que após o ano 2000 a incidência de tumores de orofaringe relacionados ao HPV aumentou em 10% em homens brancos, enquanto houve uma redução relativa na incidência destes tumores não relacionados ao HPV (relacionados ao tabaco e ao álcool), poderemos considerar que o HPV de alto risco vem atualmente desempenhando um papel importante na etiologia do carcinoma de células escamosas de orofaringe (CCEOR) (Gillisson, 2009). Modelos epidemiológicos sugerem que em 2020, nos Estados Unidos, o HPV causará mais

câncer em orofaringe do que na cérvix uterina (Chatuverdi et al, 2011; Moore e Mehta, 2015).

Indivíduos com SIDA apresentam maior risco para o desenvolvimento desses cânceres e suas lesões precursoras, sendo inclusive comum o acometimento simultâneo da região cervical, anal e oral (Chaturvedi et al, 2009; Park et al, 2009; Kreuter e Wieland, 2009; Tandon, 2010). O risco aumentado de câncer nesses pacientes está relacionado com a elevada incidência e persistência da infecção pelo HPV (Strickler et al, 2005).

Considerando-se a íntima relação do HPV de alto risco com o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas em orofaringe e que pacientes imunodeprimidos podem ter maior susceptibilidade para abrigar o HPV, estudos envolvendo o diagnóstico e seguimento de pacientes HIV-positivos infectados pelo HPV em orofaringe utilizando métodos de rotina seriam de grande importância. Daí porque o objetivo geral deste trabalho é identificar a frequência de HPV e a presença de anormalidades citológicas por ele causadas em amostras obtidas de orofarinfe de pacientes HIV-positivos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE OROFARINGE HPV-POSITIVO

2.1.1 Epidemiologia

O câncer constitui um problema de saúde pública sendo previsão da União Internacional Contra o Câncer que, em 2020, serão diagnosticados aproximadamente 20 milhões de novos casos no mundo. No Brasil, as estimativas do Ministério da Saúde (Instituto Nacional do Câncer) para 2014 são de que serão diagnosticados 15290 novos casos, sendo 11280 em homens e 4010 em mulheres, excluindo os tumores de pele não melanoma (www.inca.gov.br). Quando são analisados os dados do Ministério da Saúde referentes às estatísticas de câncer oral para 2014 observamos que os tumores de orofaringe, base da língua e tonsilas, relacionados ao HPV, são incluídos na estatística acima citada.

Embora a incidência das lesões neoplásicas do epitélio escamoso de cavidade oral e orofaringe estejam intimamente relacionada com o uso do tabaco e do álcool, nas últimas décadas se admite que em pelo menos 25% dos casos o HPV tenha um papel importante na etiologia destas neoplasias, principalmente em homens e mulheres jovens (Kreuter e Wieland, 2009, Quintero e al, 2013). Estudos mostram que o HPV pode estar ligado a etiologia de aproximadamente 75% dos tumores de orofaringe (Giuliano et al., 2008; Guily et al, 2011; Steinau et al, 2012). Admite-se que este aumento da incidência de câncer de orofaringe associado ao HPV entre 1973 a 2004 pode estar relacionado com as alterações dos hábitos sexuais (Chessa e Deitz, 2011).

2.1.2 Dados clínicos

Os carcinomas de células escamosas HPV-positivos em orofaringe tem características clínicas um pouco diferentes. Eles acometem pacientes numa faixa etária mais jovem, sendo os sintomas clínicos mais frequentes: odinofagia, dor na garganta, massa visualizada e otalgia (Moore e Mehta, 2015). Como os demais tipos

de câncer que ocorrem na boca, estas lesões se apresentam sob a forma de eritroplaca, leucoplaca, verruga comum, condiloma acuminado, hiperplasia epitelial oral focal (doença de Heck) e de neoplasias (**Figura 1**), das quais 90% são carcinomas escamosos. (Castro e Bussoloti, 2006; Syrjänen, 2005). Localizam-se com maior frequência na base da língua e orofaringe, principalmente em tonsilas palatinas (Herrero, 2003; Kreuter e Wieland 2009) e podem ter um diagnóstico tardio.

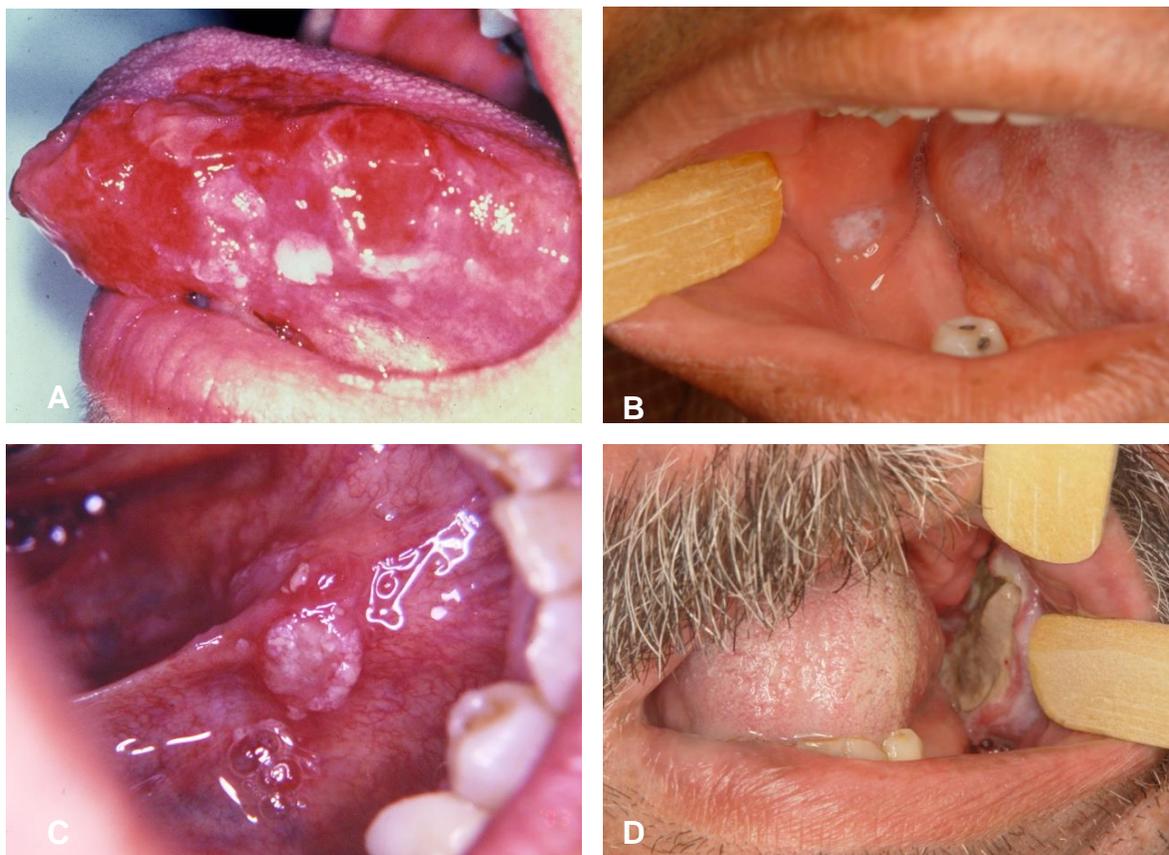


Figura 1. Lesões orais causadas pelo HPV. **A.** Eritroplaca. **B.** Leucoplaca. **C.** Verruga. **D.** Lesão Ulcerada.

2.1.3 Métodos diagnósticos

Uma vez detectada a lesão pelo exame oroscópico, o diagnóstico pode ser feito pelo exame citológico ou pela biópsia.

O exame citológico vai revelar a presença de células atípicas, com alteração da relação núcleo citoplasma e pleomorfismo nuclear, caracterizando o diagnóstico de malignidade.

Ao exame histológico o material de biópsia vai revelar a presença de um carcinoma de células escamosas que pode adquirir um padrão histológico bem moderadamente ou pouco diferenciado. Frequentemente estes tumores assumem um aspecto basalóide, sendo formados por uma porção mais superficial bem diferenciada e outra mais profunda, constituída por ilhas ou cordões de células basalóides. Na periferia, estas células se dispõem em paliçada (Neville et al, 2009). O marcador imuno-histoquímico que permite correlacionar estas neoplasias com o HPV é a expressão da proteína p16INK4a (Wang et al, 2013) (**Figura 2**).

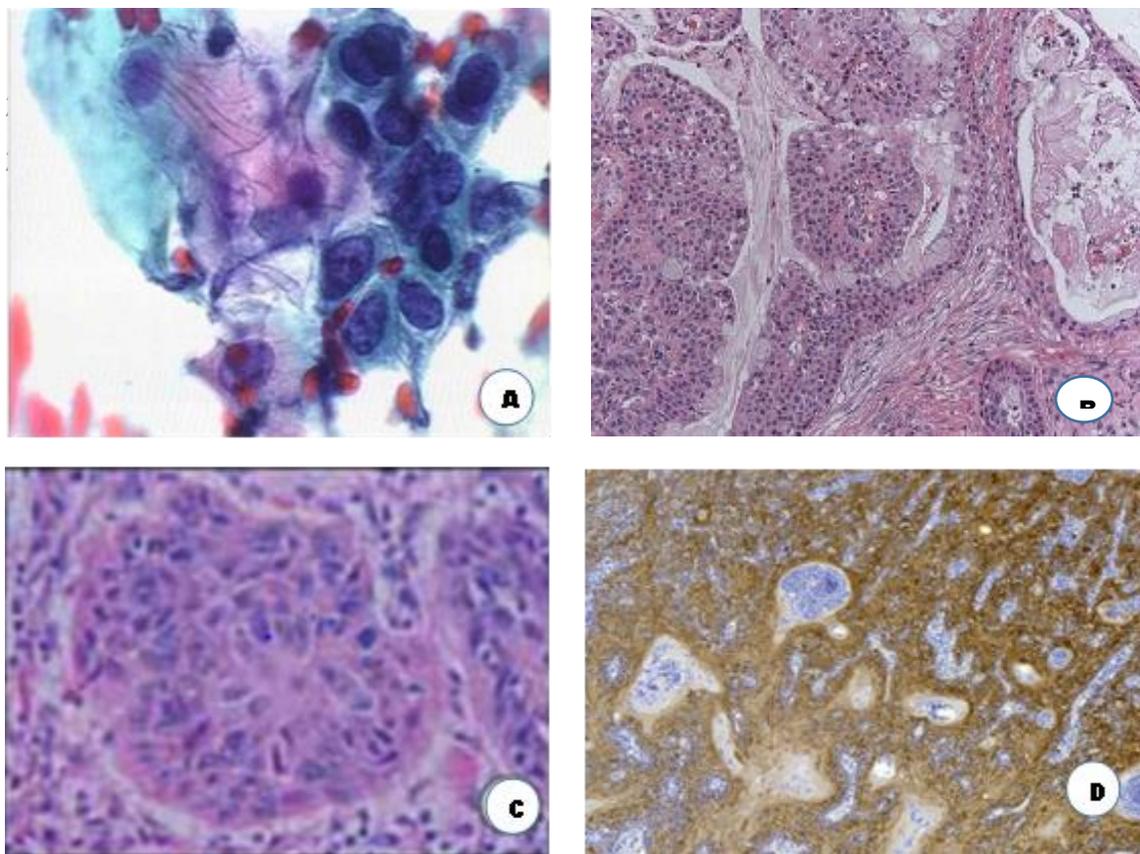


Figura 2. Aspectos citológicos e histológicos. **A** – citologia mostrando as atípias celulares. **B e C** – Aspecto histológico das células basalóides. **D** - Marcação fortemente positiva da proteína p16.

2.1.4 Tratamento e prognóstico

Os tumores malignos de orofaringe HPV positivos têm um prognóstico significativamente melhor do que o dos pacientes HPV negativos. Eles aparecem numa faixa etária mais jovem e, geralmente, são pacientes que praticam coito oral (Moore e Mehta, 2015; Wang, 2013). Como são tumores pouco diferenciados eles dão metástase linfonodais precocemente, porém apresentam uma boa resposta ao tratamento e raramente dão metástases à distância (Moore e Mehta, 2015). São tumores que demonstram uma alta expressão da p16INK4a, o que tem correlação com melhor prognóstico e maior sobrevida (Wang, 2013).

Embora pouco seja conhecido referente aos mecanismos pelos quais os carcinomas de orofaringe HPV-positivos têm maior sensibilidade à radio e quimioterapia, no tratamento destes pacientes deve ser considerada uma redução na intensidade da terapia, com menor dose de irradiação e substituição da quimioterapia simultânea.

Alguns fatores são levados em consideração para tentar justificar esta maior sensibilidade ao tratamento apresentado pelos carcinomas de orofaringe HPV-positivos. Sabendo-se que as células hipóxicas são mais resistentes à radiação, admite-se que o HPV leve a uma redução nas modificações hipóxicas nas células tumorais, tornando-as mais sensíveis ao tratamento (Lassen, 2010). Tumores associados ao HPV têm menor expressão da mutação do p53 e do fator de crescimento epidérmico (EGFR), o que também pode colaborar no tratamento (Wang, 2003).

2.2 HPV

2.2.1 Considerações gerais

O HPV é um vírus altamente transmissível, com mais de 120 tipos descritos. É um vírus epiteliotrópico e tecido específico, parasitando pele e mucosa. Dentre os tipos cutaneotrópicos temos os HPVS 1, 4, 5, 8, 41, 48, 60, 63 e 65; os mucosotrópicos são representados pelos tipos 6, 11, 13, 44, 55, 16, 31, 33, 35, 52,

58, 67, 18, 39, 45, 59, 68, 70, 26, 51, 69, 30, 53, 56, 66, 32, 42, 34, 64, 73, 54; finalmente temos aqueles que acometem pele e mucosas, que são os HPVS 2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 40, 43, 57, 61, 72 (Castellsagué, 2008). Os mucosotrópicos têm sido isolados da mucosa de cavidade oral, de orofaringe, de laringe e de esôfago (Castellsagué, 2008). De acordo com o seu papel na etiologia das lesões na mucosa genital, os genótipos são classificados em alto, baixo e médio risco. Os de alto risco são representados pelos tipos 16, 18, 31, 32, 45 e 52, enquanto que os de risco intermediário pelos tipos 33, 35, 39, 51, 52, 56, 59, 58 e 68 e os de baixo risco pelos tipos 6, 11, 42, 43, 44 e muitos outros (DeL Mistro e Bianchi, 2001; Muñoz, 2003; Raiol et al, 2009).

Na cavidade oral foram identificados 24 tipos de HPVs que causam lesão, com a seguinte classificação quanto ao potencial maligno: alto risco HPV-16, 18, 31, 33, 35 e 55; médio risco HPVs 42 e 52; baixo risco HPV-6, 11, 13, 32. Os tipos 6, 11, 16 e 18 são os mais prevalentes, tanto nas lesões orais quanto nas genitais e anais (Roseblatt, 2006). O HPV-16 é considerado responsável por cerca de 90-95% dos cânceres de orofaringe, sendo as áreas mais afetadas a base da língua e as amígdalas palatinas (Gillisson, 2009; Herrero et al, 2003; Thavaraj et al, 2011).

2.2.2 Estrutura e ciclo de vida do HPV

O papilomavírus é um vírus pequeno que, em 2004, após uma revisão na nomenclatura dos papilomavírus feita pelo International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV), foi designado como uma família de vírus, a Papillomaviridae, não relacionada ao poliomavírus. Os HPVs que comprometem revestimentos mucosos foram classificados como do gênero alfa enquanto aqueles que infectam pele foram incluídos no gênero beta. Esta classificação é baseada na análise filogenética do gen L1, que é o mais conservado de todos os HPVs (De Villiers, 2004) (**Figura 3**).

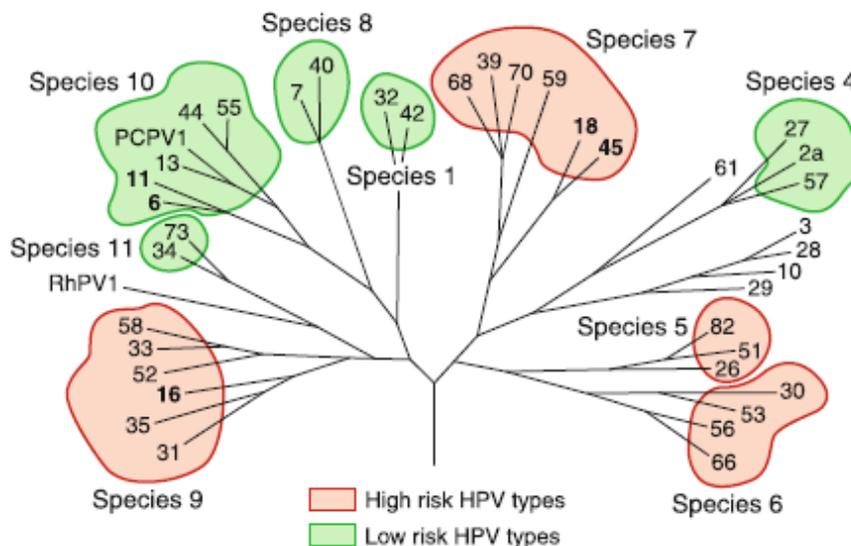


Figura 3 . Árvore filogenética do gênero alfa-papilomavírus
(Fonte: Syrjane, 2012)

O HPV tem um diâmetro de 52 a 53nm, sendo seu genoma feito de 7,200-8,000 pares de bases com peso molecular de $5,2 \times 10^6$ Daetons. Ele tem uma única circular dupla de molécula de DNA contida numa proteína esférica, o capsídeo, que é composto por 72 capsômeros de estrutura icosaédrica, sem envoltório de lipoproteína. A estrutura do genoma do HPV é dividida em três componentes gerais: 1) região gênica precoce (E), constituída por 8 *open read frames* (ORF): E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8 que são genes que se expressam precocemente. A região E é formada por oito genes onde E1 se relaciona com a replicação viral, E2 com a transcrição e replicação, E4 com a maturação viral e alteração da matriz intercelular e E5, E6 e E7 estão envolvidos na transformação celular. Os genes E6 e E7 são considerados os que têm maior poder de transformação no papilomavírus humano; 2) região gênica tardia (L), constituída por duas *open read frame* (ORF), L1 e L2, que se expressam tardiamente, e codificam a proteína principal, que representa 80% da proteína total viral e a secundária do capsídeo (Souto et al, 2005). A proteína L2, por participar na encapsidação do DNA viral é responsável pelo aumento da infectividade dos viriões do papilomavírus; 3) Região controladora longa (LCR) localizada entre as

ORFs L1 e E6, é a única região que não tem ORFs e que varia de tamanho dentre os papilomavírus (**Figura 4**).

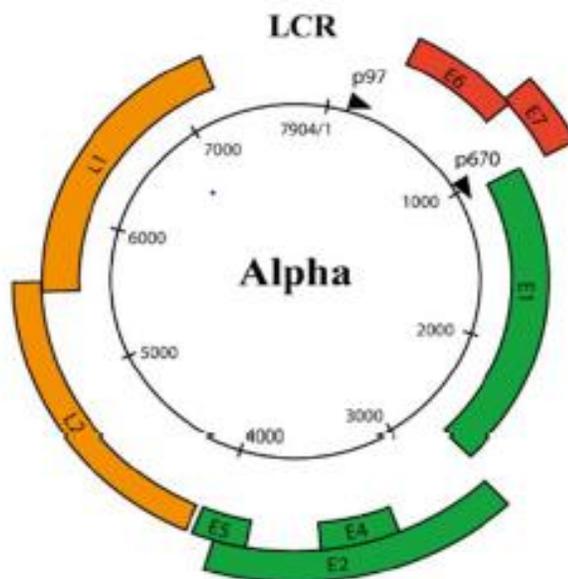


Figura 4. Mapa genético do HPV 16. Genoma circular de dupla fita com oito ORF e as regiões E, L e LCR. (Fonte: Egawa, 2015).

O ciclo reprodutivo do HPV depende da reprodução celular, daí porque a infecção inicia nas células da camada basal do epitélio, onde se encontram as células totipotentes. O vírus penetra nas células basais do epitélio por microtraumas que ocorrem no mesmo. Uma vez infectadas, as células basais distribuem o genoma do HPV para as células filhas dentre as quais uma parte permanece na camada basal, servindo de reservatório para o DNA do HPV, enquanto que as outras migram da camada basal e vão sofrer maturação anormal (Rosenblat et al, 2006). Uma vez destacadas da camada basal as células infectadas entram na fase S do ciclo celular, o que resulta na amplificação dos genomas virais em mil cópias por células. Ao mesmo tempo ocorre a síntese de proteínas E1 e E4, que juntamente com as proteínas L1 e L2 do capsídeo formam os viriões infectantes que vão ser liberados para infectar outras células (Del Mistro e Bianchi, 2001; Feller et al, 2009; Rosemblat, 2006) (**Figura 5**).

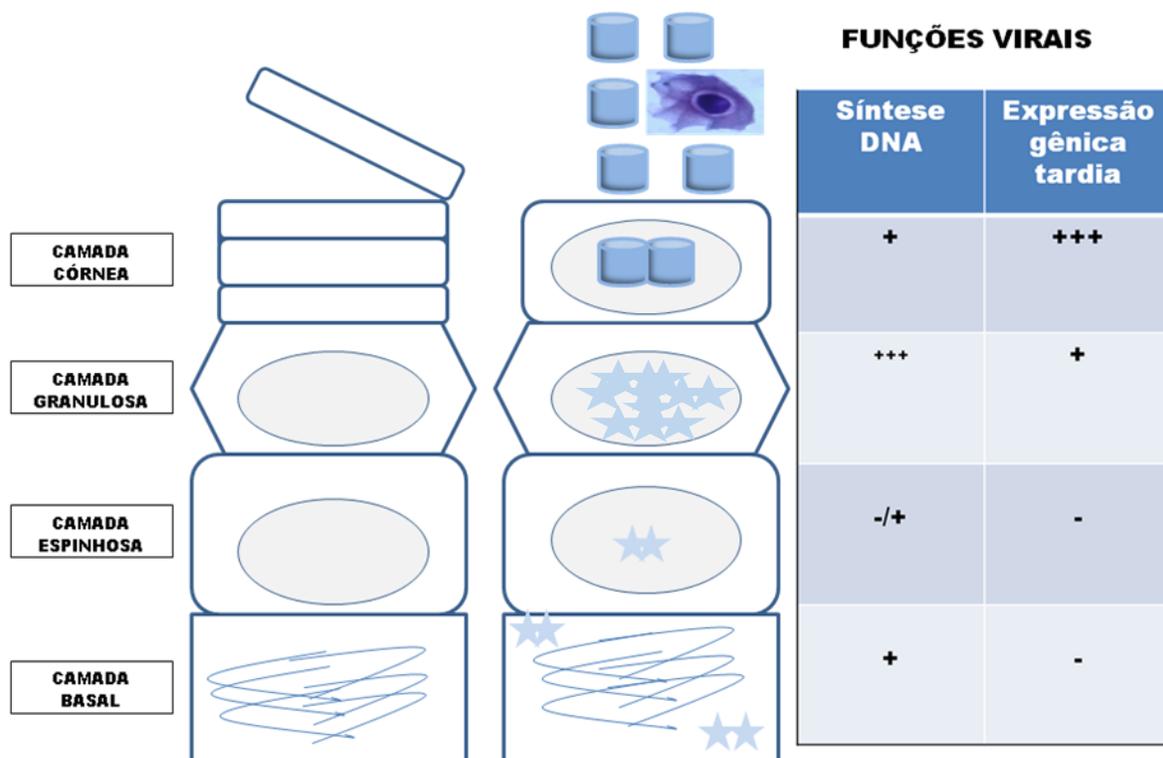


Figura 5. Interação do vírus com as células do epitélio pavimentoso (Modificado de Rosemblat et al, 2006).

A ação do vírus do HPV no epitélio estratificado vai resultar em um espessamento do mesmo com aumento do número de células na camada basal, resultante da maior proliferação das mesmas e a presença das alterações citopáticas causadas pelo vírus, que são bem evidentes nas células mais superficiais (**Figura 6**). Estas alterações, definidas como coilocitose, são representadas pela presença de um halo claro que envolve o núcleo e desloca o citoplasma para a periferia da célula, sendo o núcleo aumentado de volume, irregular e com a cromatina densa (**Figuras 5 e 6**).

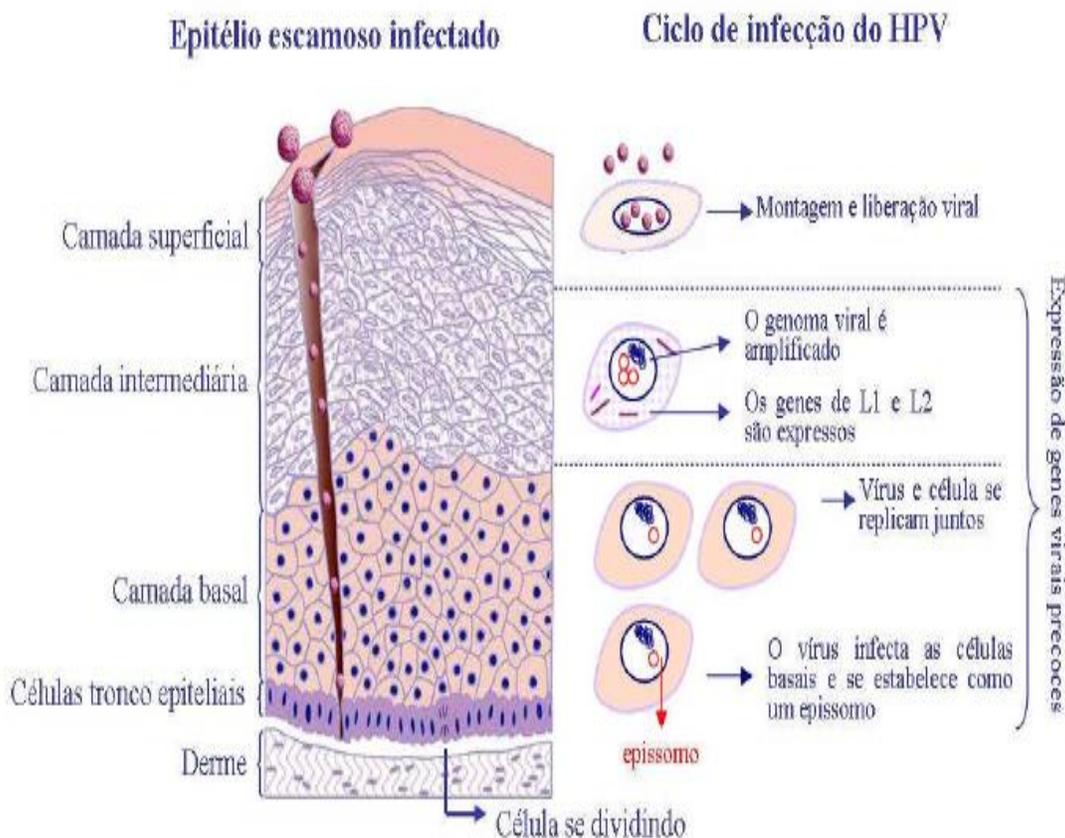


Figura 6. Representação esquemática das alterações morfológicas que ocorrem no epitélio estratificado decorrente da ação do HPV. (Fonte: Cerqueira, 2007)

2.2.3 Carcinogênese

As neoplasias malignas decorrem das alterações genômicas que ocorrem nas células levando as mesmas a adquirirem um potencial proliferativo ilimitado.

Ao penetrar no organismo o HPV vai causar, inicialmente, uma infecção e para que ela ocorra é necessário que se façam ligações ou entrada do vírus na célula epitelial do hospedeiro. São descritos receptores existentes nas células epitelial do hospedeiro tais como as $\alpha 6\beta 4$ integrinas e o sulfato de heparin proteoglican. Ao entrar na célula, o HPV parece utilizar vários receptores, sendo a $6\beta 4$ integrina considerada como receptor primário e o sulfato de heparin proteoglican como secundário. Admite-se que outros receptores serão identificados no futuro (Day e Schelhas, 2014; Syrjane, 2012). O HPV penetra na célula hospedeira por endocitose, ficando a porção L1 retida no vacúolo endocitótico enquanto que a L2,

juntamente com o restante do genoma viral, vai para o aparelho de Golgi. Uma vez atravessado o citoplasma ele penetra no núcleo, talvez por uma quebra na membrana nuclear, e vai iniciar a transcrição (Day, 2014).

Na fase ativa da infecção ocorre replicação do DNA do HPV e o genoma será amplificado atingindo até mais de 1000 cópias por células. Este processo vai culminar com a produção de partículas virais maduras e poderá ocorrer a expressão do gen viral L, sendo, finalmente, os virions liberados nas camadas superficiais do epitélio escamoso (Syrjanen, 2012) (**Figura 7**).

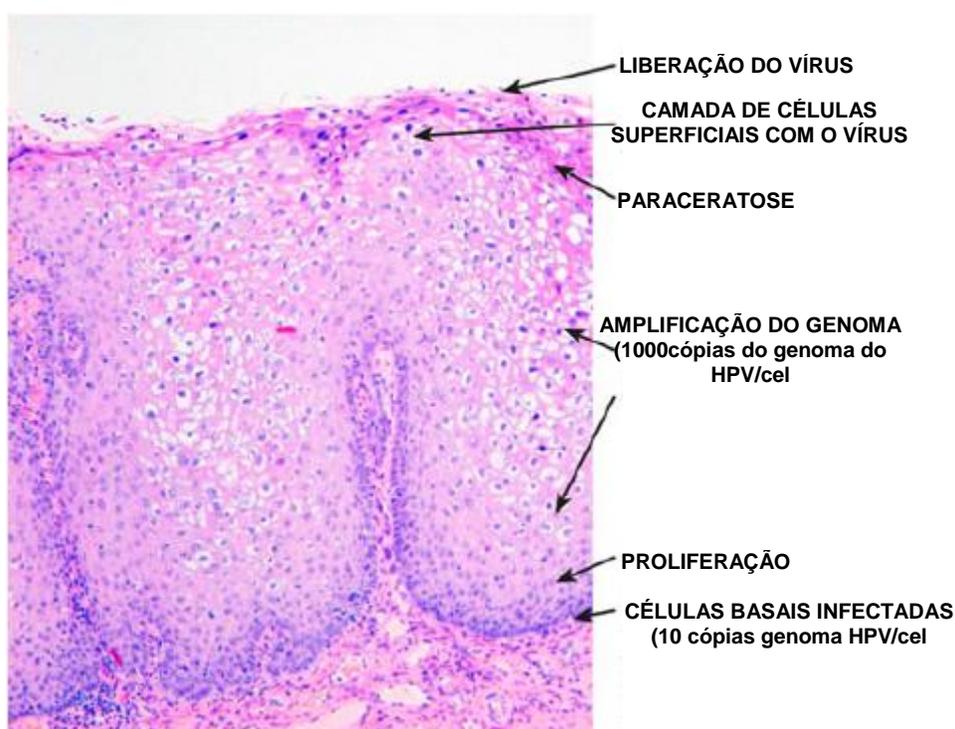


Figura 7. Infecção pelo HPV no epitélio pavimentoso estratificado.

(Fonte: Syrjane, 2012)

No núcleo da célula, o HPV se mantém em estado episomal, ou seja, separado do cromossoma da célula hospedeira e, para que ocorra a replicação nas células basais, ele vai necessitar do hospedeiro. São as DNA polimerases e a maquinaria do hospedeiro que vão permitir o funcionamento das proteínas virais E1 e E2, que são encarregadas de manter a replicação do genoma e a transcrição viral (Syrjanen, 2012).

Para iniciar a replicação a proteína E2 se liga ao LCR do HPV na origem da transcrição facilitando o recrutamento de E1, a qual é essencial para a replicação viral (Syrjanen, 2012).

A proteína E1 interage com vários genes das células basais dos hospedeiros para sincronizar a sua replicação viral e exerce um controle da transição da fase G1/S do ciclo celular e da fase S, uma vez que o DNA do HPV replica na fase S. Ela pode produzir alterações no DNA do hospedeiro que podem sinalizar uma parada no ciclo celular. A proteína E1 é também responsável por manter o HPV em estado episomal, isto é, separado do cromossoma da célula hospedeira (Syrjanen, 2012).

A proteína E2 reduz a replicação do DNA viral por meio do bloqueio do fator de transcrição. Ela possui quatro sítios que regulam a replicação viral e o início da transcrição gênica. Nas lesões neoplásicas de alto-grau a interação entre o DNA do HPV e a célula hospedeira pode levar a perda da E2 (Harari et al, 2014).

Acredita-se que a expressão das proteínas E5, E6 e E7 seja responsável pelo início e manutenção do processo que culmina com o desenvolvimento da neoplasia. Estas proteínas levam a instabilidade genética da célula induzindo a proliferação celular, inibição da apoptose e indução da ativação da telomerase.

As proteínas E6 e E7 funcionam como oncogenes dentre os alfa HPVs de alto grau. Elas descontrolam o ciclo celular nas células epiteliais mais superficiais do epitélio estratificado, as células do estrato espinhoso.

A integração do DNA do HPV de alto risco ao genoma da célula epitelial do hospedeiro é um dos primeiros passos para que se desenvolva a neoplasia, sendo considerada a alteração importante. Esta integração ocorre geralmente abaixo da região E1 e E2, levando a perda do feedback negativo exercido pela proteína reguladora viral sobre a expressão do oncogene.

A proteína E7, que se expressa principalmente no núcleo da célula, é o mais importante indutor do descontrole do ciclo celular. A ligação da oncoproteína E7 com o gene supressor Rb leva a desestabilização do gene Rb supressor e age na atividade dos inibidores p21 e p27, que vão atuar nas quinases dependentes de ciclina (CDK) ativando as CDKs (Feller et al, 2009). A ligação do produto do gene

supressor p16 com as CDKs 4 e 6 bloqueia a interação das mesmas com as ciclinas do tipo D mantendo o gene RB hipofosforilado, o qual se liga ao fator de transcrição E2 e previne a progressão do ciclo celular (Westra, 2014). Assim, vemos que a ativação de E7 pode ser controlada por meio da interação direta com a E2. Nas lesões neoplásicas de alto grau pode ocorrer perda da E2 o que leva a uma superexpressão da E7, resultando em progressão do ciclo celular e progressão da neoplasia, com liberação da transcrição do gen *p16INK4*, causando liberação de altos níveis de p16INKA, que vai ser expresso nos cortes histológicos corados pela imuno-histoquímica (Harari et al, 2014; Wang et al, 2013).

A proteína E6 pode se localizar tanto no núcleo quanto no citoplasma das células e tem uma importante função na degradação do *p53*, gen supressor tumoral. Para exercer tal função a proteína E6 se liga a ligase da ubiquinina da célula hospedeira, tornando-se capaz de se ligar a proteína p53. Com a degradação do *p53* os pontos G1/S e G2/M do ciclo celular não são verificados e a telomerase é ativada, perpetuando a vida das células (Rosenblat et al, 2006).

A proteína E5 define o início e a parada da codificação em alfa HPVs de alto risco humanos. É uma proteína transmembranar, que tem uma ação na fase produtiva do ciclo do HPV, porém seu mecanismo de ação não é bem estabelecido. Ela não possui atividade intrínseca e age alterando a atividade das proteínas de membrana das células da proliferação (Rosenblat et al, 2006). Halavaty et al (2014), identificaram um novo padrão de ligação da E5, a proteína A4, localizado em região perinuclear. Em queratinócitos normais a proteína A4 é vista em células basais enquanto que em células contaminadas pelo HPV ela pode ser vista tanto em células diferenciadas quanto nas indiferenciadas (Halavaty et al, 2014). Estudos de Halavaty et al (2014) sugerem que a proteína A4 é um importante ligante da proteína E5 e tem uma ação na regulação da proliferação e na habilidade de diferenciação celular. A proteína E5 também tem o papel de interagir com o fator de crescimento epidérmico (EGF) e com o fator de crescimento derivado das plaquetas (PGDF) para agir na proliferação celular (Harari, 2014).

A proteína E4 localiza-se na região precoce *E*, sendo o gene expresso de forma tardia e atuando na infecção produtiva. As funções tardias do papilomavírus são representadas pela síntese vegetativa de DNA viral, síntese de proteínas do capsídeo e elaboração do vírion nos queratinócitos diferenciados. Embora a E4 não seja encontrada nos vírions ela é responsável por induzir o colapso na rede de citoqueratinas, atuando na liberação do vírus da célula hospedeira (Rosenblat et al, 2006).

Os genes tardios L1 e L2 atuam na maturação e agrupamento dos viriões para serem liberados pelas células epiteliais.

Tabela 1. Esquema relacionando a função dos diferentes genes do HPV.

Gene	Função
E1	Sincroniza a replicação viral com a do hospedeiro. Controla a transição da fase G1/S e da fase S do ciclo celular.
E2	Bloqueia o fator de transcrição reduzindo a replicação do DNA viral.
E3	Sem função conhecida atualmente
E4	Induz o colapso de rede de queratina liberando os vírions da célula hospedeira.
E5	Regula a proliferação celular.
E6	Age na degradação do gene supressor p53.
E7	Desestabiliza o gene supressor Rb permitindo a progressão para a fase S do ciclo celular e age na atividade dos inibidores p21 e p27. Liga-se com a E2 prevenindo a progressão do ciclo celular.
E8	Sem função conhecida (presente em uma minoria de HPVs).
L1 L2	Maturação e agrupamento dos vírions para serem liberados.

Desta forma, nas fases iniciais da infecção o DNA do HPV infecta as células da camada basal se estabelecendo na forma epissomal, havendo um espessamento desta camada. Posteriormente, o gene e a célula passam a se reproduzir juntos, sendo observada a expressão de E1 e E2 nas camadas intermediárias, caracterizando as lesões intraepiteliais de baixo grau, onde a replicação viral é mantida. Posteriormente, ocorre a integração do DNA do HPV com o da célula hospedeira, iniciando a proliferação desordenada das células, aparecendo a lesão intraepitelial de alto grau com posterior invasão e ocorrendo a expressão de E6 e E7 (Figura 8).

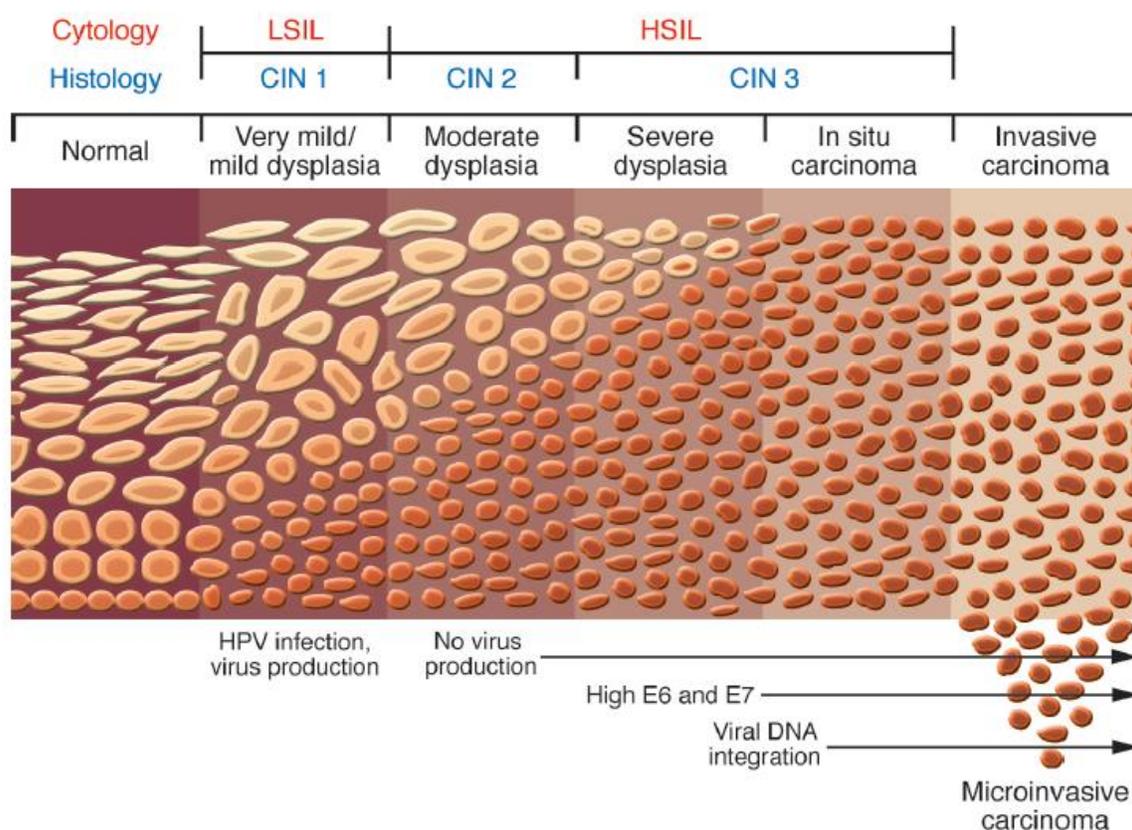


Figura 8. Efeito das proteínas virais na progressão da lesão.

(Fonte: Douglas e Schiller, 2006)

O gênero alfa dos HPVs filogeneticamente relacionados podem induzir variáveis graus de neoplasias intraepiteliais, especialmente os alfa 9, dentre os quais esta situado o HPV16. O HPV16 é o único que tem habilidade de estabelecer a

persistência que é associada com a progressão neoplásica. Esta progressão se dá inicialmente com a proliferação das células da camada basal, as quais vão substituir inicialmente o terço inferior do epitélio caracterizando a neoplasia intraepitelial de grau I. Posteriormente, estas células vão ocupando os terços médio e superior do epitélio caracterizando as neoplasias intraepiteliais de grau II e III, respectivamente. Quando estas células rompem a membrana basal do revestimento epitelial em pequenos ninhos, caracteriza-se o carcinoma microinvasor. Finalmente estes pequenos ninhos continuam proliferando formando grandes aglomerados celulares e transformando-se no carcinoma invasor (**Figura 9**).

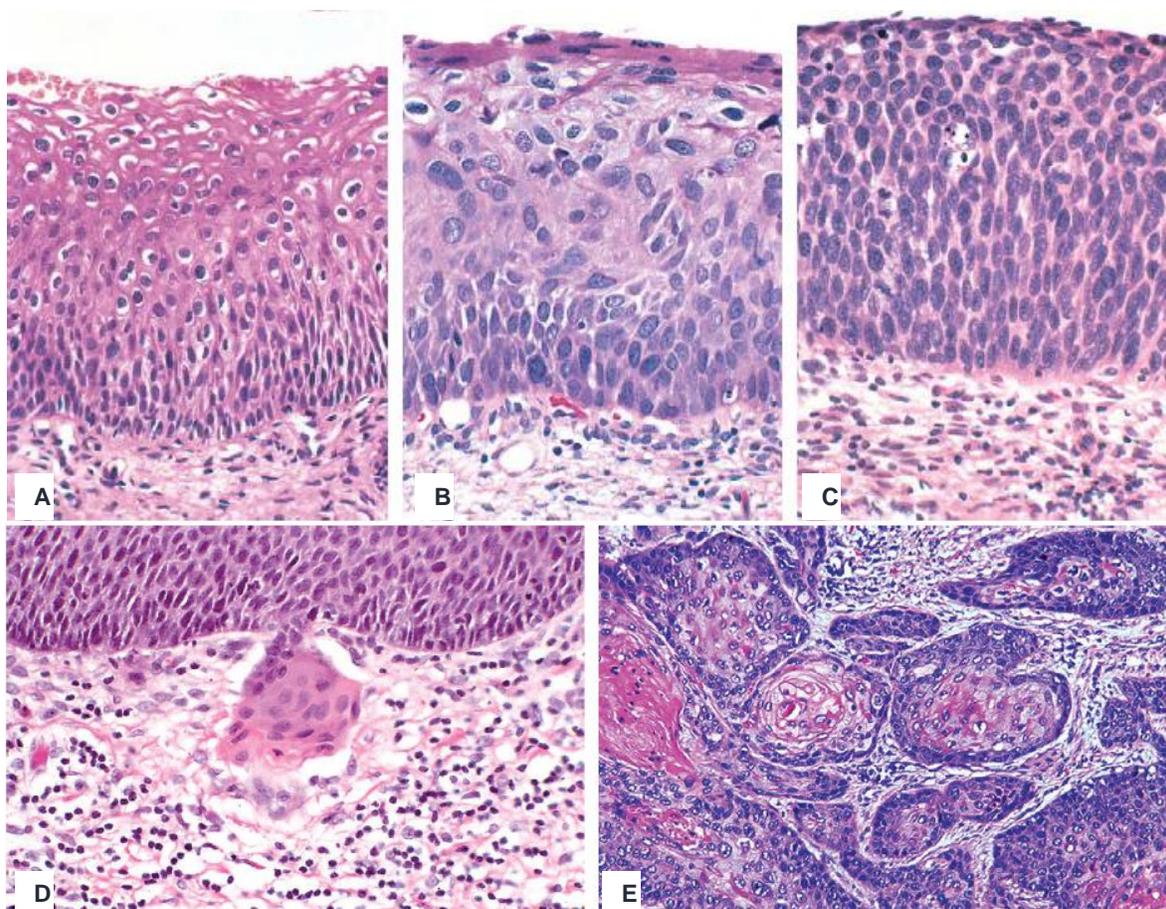


Figura 9. Corte histológicos mostrando a progressão neoplásica no epitélio pavimentoso estratificado. **A.** Neoplasia intraepitelial de grau I. **B.** Neoplasia intraepitelial de grau II. **C.** Neoplasia intraepitelial de grau III. **D.** Carcinoma microinvasor. **E.** Carcinoma invasor. (Fonte: Kumar et al, 2010)

2.2.4 Infecção pelo HPV

A infecção pelo HPV pode ser classificada como: 1) latente, a qual tem baixa carga viral nas células basais, sendo insuficiente para transmitir e só podendo ser diagnosticada por métodos de biologia molecular; 2) subclínica, a qual é ativa, porém não apresenta sintomas clínicos, podendo ser diagnosticada por exames como a peniscopia, colposcopia, colpocitologia e ou biópsia; 3) clínica, na qual as lesões são evidentes ao exame macroscópico (Feller 2009).

Há uma variação muito grande na prevalência do HPV de acordo com a idade. A maior prevalência da infecção subclínica ocorre na idade de maior atividade sexual, a qual pode atingir 40% na população feminina. Acima de 30 anos esta prevalência cai para 5-10%, ocorrendo um segundo pico na pós e pré-menopausa (Castellsagué, 2008). As justificativas para este aumento da prevalência na menopausa não são bem claras, podendo ser decorrente de uma reativação da infecção latente devido à perda da imunidade específica ou a uma nova infecção, resultante do contacto com um novo parceiro (Franco e Trottier, 2006). Na mucosa oral normal, sem alterações macroscópicas ao exame ectoscópico, a prevalência do HPV é variável, indo de 0 a 81% (Xavier et al, 2007).

O tempo de vida média da infecção pelo HPV é maior, em torno de 8-10 meses para o HPV de alto risco, caindo para aproximadamente a metade nos casos de infecção pelo HPV de baixo risco. A resolução da infecção permite certo grau de proteção contra uma reinfecção. Aproximadamente 90% das pessoas infectadas apresentam resolução espontânea, persistindo a infecção em um pequeno grupo de pacientes. Este pequeno grupo que permanece infectado é o que apresenta altos riscos de desenvolver neoplasias (Castellsagué, 2008).

2.2.5 HPV e HIV

São considerados como fatores responsáveis pela progressão da infecção, o tipo de vírus, a persistência da infecção por um longo período, a carga viral por unidade de célula e a integração do DNA viral com o DNA da célula. Sabe-se que a infecção pelo vírus da imunodeficiência é considerada como um fator de risco para a infecção pelo HPV, assim como para a progressão neoplásica (Castellsagué, 2008; Chiao, 2006). Pacientes infectados com HIV tem um risco aumentado para todos os

cânceres associados ao HPV: de colo, vagina e vulva nas mulheres e de pênis e anal nos homens (Chiao, 2006; Gillison, 2009; Kreuter e Wieland, 2009). Outros fatores de progressão bem estabelecidos são o uso prolongado de contraceptivos orais, alta paridade e o uso do tabaco (Castellsagué, 2008). Estudos epidemiológicos mostram que a maioria das neoplasias se desenvolve aproximadamente após um ano de infecção pelo HPV (Castellsagué, 2008). Há estimativas de que 80% dos cânceres anais, 99,7% dos cânceres cervicais, 30% dos de vulva, vagina e pênis, 20% dos de orofaringe e 10% dos de laringe são atribuíveis ao HPV (Roseblatt, 2006; Trottier e Franco, 2006).

São recentes os estudos realizados correlacionando o HPV com o desenvolvimento de lesões neoplásicas em pacientes HIV positivos. A incidência de neoplasia intraepitelial anal é maior nestes pacientes, sendo muito frequente em homossexuais do sexo masculino. Estudos realizados em São Francisco com homossexuais masculinos portadores do HIV, mostraram que 98% estavam infectados pelo HPV e que 81% tinham lesão intraepitelial anal, dentre os quais 52% eram de alto grau (Kreuter e Wieland 2009). A terapia antirretroviral parece ter relação com o maior risco de desenvolvimento de neoplasia intraepitelial anal (Abramowitz et al, 2007; Kreuter, Wieland, 2009) e não tem relação com a regressão destas neoplasias (Abramowitz et al, 2007). O exame dos esfregaços citológicos anais nestes pacientes para rastrear neoplasia tem mostrado alta sensibilidade (69 a 93%) e alta especificidade (32 a 59%) (Chiao, 2006).

2.2.6 Vias de infecção

O HPV pode ser transmitido de forma horizontal ou vertical, por via sexual ou não sexual (direta ou indireta) (La Cour, 2012).

A transmissão horizontal pode ocorrer por meio do contato físico via auto ou heteroinoculação, contato sexual, transmissão direta por fômites ou pelo beijo (Mammas et al, 2014). Ela ocorre principalmente pelo ato sexual, sendo o colo uterino (zona de transformação) e o canal anal (linha pectínea) os órgãos mais

acometidos. A vulva, a vagina, o pênis e a orofaringe também são locais suscetíveis de infecção (Castellsagué, 2008).

A auto-inoculação ocorre pela transmissão do HPV de um sítio a outro por meio de arranhadura ou pelo banho. O sexual é o modo primário de transmissão e ocorre por meio da penetração sexual ou por contatos íntimos genitais. Fômites contaminados podem penetrar no organismo por pequenas lesões na pele (La Cour, 2012). Para compreendermos a transmissão por meio do beijo se torna importante que saibamos que ele representa várias funções: a erótica, exercida pelos lábios, sendo as outras representadas pela participação na alimentação, emissão dos sons e sensorial. A cultura Greco-romana, que considerava o beijo como sinal de respeito, usado para fechar um acordo, classificava os beijos em *savolium*, *basium* e *osculum*. Atualmente sabe-se que existem cinco tipos de beijos: o gestual, o cultural, o orogenital, o *basium* ou básico (beijo no lábio), *savolium* (beijo profundo) e o *osculum* (beijar a bochecha, beijo de amizade) (<https://archiveofourown.org/works/113376>). Os beijos *savolium* e orogenital envolvem contato das mucosas oral e genital, o que permite a transferência de microorganismos, seja pela saliva ou pelo contato direto entre as mucosas. Trabalhos mostram que não somente o HPV pode ser transmitido por via oral, porém também outros vírus como o herpesvírus, o vírus de Epstein-Barr, o vírus hepatocelular e o HPV (Balfour et al, 2015; Donovan, 2004; Mammas et al, 2014; Touyz et al, 2012,).

A transmissão por via vertical, que ocorre de mãe para filho, pode ser pré-natal ou neonatal, podendo ocorrer no canal do parto ou pela placenta (Mi Lee, 2013; Syrjanen, 2011). Estudos avaliando transmissão por via vertical perinatal, que ocorre no canal do parto, mostram resultados que variam de 5 a 72% (La Cour, 2014). Enquanto uns consideram que este tipo de transmissão é muito rara (Saini et al, 2010), outros acham que ela aumenta com a passagem da criança pela cérvix infectada (Park et al, 2012). Quanto à transmissão pelo líquido amniótico, as opiniões são controversas (La Cour, 2014). Ruffin et al (2006), em uma análise do líquido amniótico colhido por amniocentese de 146 mulheres, detectaram que não há evidências de que o HPV atravesse o líquido amniótico. Na transmissão vertical o HPV pode desenvolver infecção subclínica ou clínica, a qual pode se manifestar nas

crianças sob a forma de verrugas em pele, verrugas genitais e papilomatose recorrente juvenil, observada em adolescentes (Mammas, 2014). Na maioria dos casos a infecção não persiste e, com o passar do tempo, ocorre depuração do DNA do HPV (Park, 2012).

2.2.7 Métodos diagnósticos

Pode-se suspeitar de HPV ao exame ectoscópico da mucosa oral, porém o diagnóstico só poderá ser feito, inicialmente, pela detecção das alterações morfológicas, por meio do exame citológico ou da biópsia. Como nos esfregaços citológicos de colo uterino, a utilização de técnicas de exploração moleculares se faz sempre necessária, para confirmação da etiologia viral.

A citologia esfoliativa é uma técnica simples, de baixo custo, não invasiva, rápida e que apresenta boa sensibilidade e especificidade na análise das lesões orais. Em meta-análise, Dolens (2013) encontrou uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 76,7% no uso da citologia esfoliativa para o diagnóstico das lesões orais. Embora o sistema de Bethesda ofereça melhor correlação entre os achados clínicos e patológicos no diagnóstico citológico das lesões de cérvix uterina, ele tem sido muito pouco usado no diagnóstico citológico das lesões orais (Kedra et al, 2012; Vianna, 2008). Os trabalhos mais antigos classificavam como displasia de alto, moderado ou baixo grau, passando posteriormente a classificar como neoplasia intra-epitelial de grau leve, moderado e avançado. Outros falavam somente em atipias e não classificavam. Os critérios citológicos para o diagnóstico de HPV na cavidade oral são difíceis de serem estabelecidos, uma vez que o coilócito clássico é raro no esfregaço citológico oral (Vianna, 2008). Alguns autores estabelecem critérios maiores (coilócito clássico, halo perinuclear e displasia nuclear) e critérios menores (disqueratose, metaplasia imatura atípica, macrócitos e binucleação) (Castro e Bussoloti, 2006). Na maioria dos casos as alterações citológicas são mal definidas, não se evidenciando a presença do coilócito típico (Vianna, 2008).

Os métodos utilizados para analisar o DNA do HPV são a reação em cadeia da polimerase (PCR), a hibridização e a técnica de *microarray*. A imuno-histoquímica também pode ser utilizada para detectar o HPV ou a proteína p16INK4a.

A reação em cadeia da polimerase é uma técnica considerada altamente sensível que se baseia na amplificação de sequências específicas de DNA. O PCR é a técnica mais utilizada para detecção do DNA do HPV na cavidade bucal (Herrero, 2003; Hong et al, 2012; Miller e Johnstone, 2001; Quintero, 2013; Thavaraj et al, 2011). Embora ela seja considerada a técnica mais sensível, os estudos que estabelecem comparação entre o PCR e outras técnicas, por vezes, mostram resultados semelhantes quanto a sensibilidade e a especificidade (Chung et al, 2014) ou até mesmo resultados melhores com as outras técnicas.

Na prática clínica, dentre as técnicas de hibridização, a captura híbrida é a mais utilizada para analisar os esfregaços ginecológicos de cérvix uterina. Para os esfregaços de cavidade oral e orofaringe, a captura híbrida não é uma técnica rotineiramente utilizada (Hooper et al, 2015; Terry et al, 2001). Enquanto alguns autores a consideram com melhor sensibilidade (Chung, 2014; Boldrini et al, 2014; Luu, 2013) outros acham que não há diferença entre ela e o PCR (Tsiodras et al, 2010).

A técnica de *microarray*, que faz a genotipagem, baseia-se na imobilização, em um biochip, de milhares de fragmentos de DNA representando milhares de genes. Após a hibridização com o cDNA das amostras em estudo, faz-se a análise da expressão dos genes com base na intensidade da reação para cada um dos fragmentos. Com esta técnica pode-se determinar a expressão de milhares de genes em um único experimento (Brasileiro, 2004). É uma técnica pouco utilizada para o estudo do HPV oral (Pugliese et al, 2014; Steinau, 2012).

A imuno-histoquímica, técnica na qual o antígeno é detectado por meio de uma reação antígeno anticorpo, é de fácil utilização, por poder ser feita tanto em amostras incluídas em blocos de parafina quanto em tecidos congelados ou em esfregaços citológicos, quando é designada como imunocitoquímica. Ela apresenta sensibilidade e especificidade maior do que o esfregaço corado pelo Papanicolaou.

A proteína p16INK4a, que se superexpressa no núcleo e no citoplasma das células neoplásicas infectadas pelo DNA do HPV, é utilizada para a detecção de neoplasia intraepitelial e do câncer cervical. Ela é útil quando há dificuldade no exame citológico vaginal para definir se a lesão é benigna ou maligna (Bibbo et al, 2003). Estudos mostram que a p16INK4a também pode ser utilizada na detecção do câncer de orofaringe (Cantarutti et al, 2014; Hong, 2012; Thavaraj, 2011).

2.3 HPV E CÂNCER EM OROFARINGE

Entre os anos de 1988 e 2004 houve um aumento de 225% na incidência do câncer de orofaringe HPV-positivo, ocorrendo concomitantemente uma redução de 50% na incidência dos tumores HPV-negativos. Existem estimativas de que em 2020 a incidência de tumores HPV-positivos em orofaringe será maior do que a do câncer cervical (Khariwala et al, 2015).

Os tumores HPV-positivos têm, geralmente, um padrão histológico pouco diferenciado, com áreas basalóides e expressam a proteína p16INK4 no exame imuno-histoquímico.

Os fatores de risco considerados para os tumores de pacientes HPV-positivos são diferentes daqueles dos utilizados para os pacientes HPV-negativos. Nos pacientes HPV-positivos fatores de risco como o uso do tabaco e do álcool e predominância no sexo masculino não são tão importantes como o tipo de relacionamento sexual, a prática do coito oral e o número de parceiros (Khariwala et al, 2015).

3. JUSTIFICATIVA

Embora a etiologia do carcinoma escamoso de cavidade oral e orofaringe tenha durante anos sido atribuída ao uso do tabaco e do álcool, associado à má higiene oral, atualmente sabe-se que o HPV vem desempenhando um papel importante na etiologia destas neoplasias. Como na cérvix uterina, estas neoplasias passam por uma fase inicial de lesão intraepitelial que, se tratada adequadamente, pode ser curada. Considerando-se que os tumores ligados ao HPV apresentam um prognóstico melhor e necessitam de uma abordagem diferente, estudos são necessários no sentido de estabelecer um diagnóstico precoce visando um tratamento eficaz. A citologia corada pelo método do Papanicolaou é um exame de baixo custo e rápido que detecta estas lesões ainda em fase intraepitelial, podendo ser usada de rotina pelos profissionais da área de saúde bucal, diante de lesões suspeitas. Para confirmar a etiologia ligada ao HPV, testes moleculares se fazem necessários. Embora a maioria dos autores utilize o PCR para detectar o HPV, outras técnicas de exploração, como a captura híbrida, pode ser levada em consideração a fim de que se defina um método diagnóstico seguro e acessível para detectar a infecção.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a frequência de HPV e presença de anormalidades citológicas por ele causadas em amostras obtidas de orofaringe de pacientes HIV-positivos atendidos no ambulatório de DIP/HUB.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a frequência de tipos de HPV de baixo e alto risco e suas respectivas estimativas de carga viral na cavidade oral de pacientes HIV-positivos, por meio da captura híbrida e do PCR,
2. Verificar a concordância entre captura híbrida e PCR para a detecção de HPV em amostras citológicas obtidas de orofaringe de pacientes HIV-positivos,
3. Analisar a associação entre a presença de HPV e possíveis fatores de risco para esta infecção (gênero, idade dos pacientes em anos, lesão oral evidente, contagem de $CD4^+/mm^3$, tempo de infecção pelo HIV em anos, uso de TARV, fumo, álcool, maconha, outras drogas, coito oral, coito anal, uso de preservativo, opção sexual, número de parceiros/ano, doenças sexualmente transmissíveis) em amostras obtidas de orofaringe de pacientes HIV-positivos,
4. Observar a frequência de anormalidades citológicas categorizadas de acordo com o Sistema Bethesda nas amostras obtidas de orofaringe de pacientes HIV-positivos,
5. Detectar se há associação entre anormalidades citológicas e a presença de HPV em amostras citológicas obtidas de orofaringe de pacientes HIV-positivos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRA DO ESTUDO

Foi realizado um estudo **seccional** tendo como universo 100 dentre os aproximadamente 600 pacientes HIV positivos acompanhados nos ambulatórios de DIP/SIDA do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Todos os pacientes de ambos os sexos eram HIV-positivos, tinham acima de 18 anos e foram examinados com a finalidade de detectar o HPV na orofaringe (base da língua, palato mole, amígdalas palatina e regiões lateral e posterior da garganta).

O **critério de inclusão** foi o diagnóstico de certeza de infecção pelo HIV com sorologia positiva (ELISA) e confirmada pelo teste Western Blot ou pela imunofluorescência.

Os **critérios de exclusão** foram pacientes menores de 18 anos.

Inicialmente, foi aplicado um questionário estruturado cujos dados explorados visavam uma melhor análise na formulação do diagnóstico (Apêndice B) e, posteriormente, foi realizada a coleta do material. O questionário levou em consideração a carga viral do HIV, a presença de lesões ano-genitais, a opção sexual dos pacientes, a história pregressa de doenças sexualmente transmissíveis, o número de parceiros, o uso de drogas e o comportamento epidemiológico de risco para desenvolvimento de neoplasias orofaríngeas (tabagismo, etilismo).

5.2 ASPECTOS ÉTICOS

Só participaram da pesquisa os pacientes que concordaram com os termos do trabalho e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A). O projeto de pesquisa com o número 019/2011 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-FM.

5.3 EXAME DA OROFARINGE

O exame em orofaringe foi feito com o auxílio de luz artificial proveniente de um fotóforo, e teve como objetivo detectar alterações de forma, coloração e volume, visando localizar as possíveis lesões provocadas pelo HPV ou qualquer outro agente na mucosa orofaríngea. Foram pesquisadas áreas leucoplásicas ou eritroplásicas, lesões papilomatosas ou mesmo nódulos, ulcerados ou não.

Em todos os casos examinados a coleta do material foi feita em orofaringe, com especial atenção em pilar anterior e posterior, amígdalas palatinas, palato mole e base da língua. Nos casos em que a oroscopia revelou algumas das alterações acima descritas, em localizações outras que não a orofaringe, foi realizada uma segunda coleta na área lesada.

A coleta foi feita na seguinte sequência: inicialmente foi retirado material para a citologia convencional e imunocitoquímica, depois para o meio líquido, posteriormente para a captura híbrida e, finalmente, para o PCR. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM-UnB) onde, no Laboratório de Imuno-histoquímica, foram preparadas e examinadas as lâminas para a citologia convencional, a imunocitoquímica e a captura híbrida. O PCR foi realizado no Laboratório de Histopatologia Bucal do Departamento de Odontologia, da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB (FS-UnB). As lâminas da citologia em meio líquido foram processadas no Laboratório MICRA.

Para a citologia em meio líquido a coleta foi feita com o KIT de coleta do ThinPrep PAP TEST, sendo a escova friccionada nas áreas acima citadas e o material colhido acondicionado no Preserv Cyt R Solution.

O material para o PCR foi armazenado a 4°C e para a captura híbrida foram armazenados a temperatura de -20°C até o momento dos procedimentos laboratoriais para iniciar a análise.

5.4 EXAME CITOLÓGICO

5.3.1 Coleta

Para a citologia convencional e imunocitoquímica os esfregaços foram decorrentes de uma única coleta, feita com escova do tipo endocervical (Kolplast Comercial Industrial de Brasil Ltda), a qual foi friccionada sobre as áreas acima citadas. Os esfregaços foram feitos em lâminas de vidro, com movimentos de rotação e zigue-zague para que toda a superfície fosse preenchida. Para a imunocitoquímica as lâminas se encontravam silanizadas. Logo após a coleta os esfregaços foram imediatamente fixados com o fixador Peg-polietilenoglicol, o qual apresenta a seguinte constituição: 250g de polietileoglicol 6000, 300ml de água destilada e 5l de álcool a 100%. Para a citologia convencional as lâminas foram coradas pelo método de Papanicolaou.

5.3.2 Avaliação citológica

Todas as amostras foram preparadas pelo método convencional e em meio líquido. As lâminas de citologia convencional e em base líquida foram examinadas por dois observadores. O diagnóstico final foi determinado pela concordância entre os observadores.

A classificação dos resultados citológicos utilizou a nomenclatura baseada no sistema Bethesda 2001 e da Sociedade Brasileira de Citopatologia (SBC), sendo as **lesões intra-epiteliais escamosas** designadas como **de baixo (LSIL)** e **alto (HSIL) grau**, onde as alterações causadas pelo **HPV** e as **neoplasias intra-epiteliais de grau I** foram classificadas como **baixo grau** e as **neoplasias intra-epiteliais de grau II e III** como de **alto grau**. As **células escamosas atípicas** foram classificadas como **de significado indeterminado (ASC-US)** ou **onde não é possível excluir lesão de alto grau (ASC-H)**. A celularidade mínima para considerar a amostra

satisfatória foi de 5000 células escamosas para a citologia em meio líquido e de 8000 a 12000 para os esfregaços convencionais (Solomon e Nayar, 2004).

5.3.3 Imunocitoquímica

A imunocitoquímica avaliou a expressão da proteína p16INK4a, considerada o marcador de células cervicais escamosas e glandulares displásicas.

O método utilizado para amplificação da reação foi o da Estreptoavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB) e sua revelação foi realizada com utilização do 3-4, Diaminobenzidina (DAB).

A reação imunocitoquímica foi realizada seguindo as seguintes etapas:

1. Recuperação antigênica: Realizada com tampão citrato (10mM - pH6,0) em vaporizador (*Steamer*) entre 95 a 99°C, por 40min, com as lâminas submersas neste tampão.
2. Resfriamento à temperatura ambiente, imersas no tampão citrato por 20min.
3. Lavagem das lâminas em água destilada em cinco banhos.
4. Bloqueio da peroxidase endógena: com peróxido de hidrogênio + DH₂O na proporção de 26ml de H₂O₂ para 230mL de DH₂O – 2 banhos de 15 minutos.
5. Lavagens em água destilada em três banhos.
6. Mergulhar por 5 minutos. Em tampão TBS + tween, Retirar o excesso de TBS + tween com papel toalha para serem submetidas à imunocoloração.
7. Incubação das lâminas contendo as amostras com o anticorpo primário anti-p16 INK4a (clone G175-405, diluição 1/200) 1/200 em câmara úmida *overnight* (18 horas) sob refrigeração (2-8° C).
8. Lavagem das lâminas com TBS + tween a fim de retirar o excedente de anticorpo do material em 3 banhos de 3min minutos cada, retirar o excesso de TBS + tween com papel toalha.
9. Em seguida foi feita a incubação com o anticorpo secundário biotilado (kit LSAB, Dako Cytomation) em câmara úmida a temperatura ambiente (ar condicionado 18 a 22°C).

10. Lavagem das lâminas com TBS + tween em 3 banhos de 5 minutos cada, retirar o excesso de TBS + tween com papel toalha.
11. Em seguida, foi feita a incubação com o complexo streptavidina-peroxidase (kit LSAB, Dako Cytomation) em câmara úmida a temperatura ambiente (ar condicionado 18 a 22°C) durante 30 minutos.
12. Lavagem das lâminas com TBS + tween em 3 banhos de 5 minutos cada, retirar o excesso de TBS + tween com papel toalha.
13. Revelação: A imunocoloração foi desenvolvida pela adição de substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB) (100mg%) com tampão de diluição.
14. Lavagem em água destilada.
15. Contra coloração com Hematoxilina de Harris.
16. Lavagens em água corrente.
17. Desidratação em banhos de álcoois (5 banhos).
18. Diafanização em banhos de xilol (4 banhos).
19. Montagem com meio de montagem permanente (Entellan, Merck, Alemanha) e lamínula.

Para assegurar o desempenho das reações imunocitoquímicas das proteínas p16 foi utilizado como controle positivo de p16 um corte histológico de carcinoma de colo uterino. Foi considerada reação positiva para a proteína p16 todas as células que apresentaram cor acastanhada com contornos nítidos e homogêneos no núcleo e citoplasma. As lâminas de imunocitoquímica foram analisadas por meio de um estudo “duplo cego” por dois patologistas independentes, para os resultados da citologia convencional e em base líquida.

5.4 EXAME MOLECULAR

5.4.1 Captura híbrida

A amostra foi colhida friccionando 10 vezes a escova do tipo endocervical (Kolplast Comercial Industrial de Brasil Ltda) sobre as áreas acima citadas. A

pesquisa do DNA-HPV de alto e baixo risco foi realizada pela técnica de captura híbrida de 2ª geração (KIT DAN-PAP da Digene®), em amostra preservada em meio fixador (Universal Medium Collection - UCM Digene®). O material foi processado conforme orientações do fabricante usando um coquetel de sondas de RNA para detectar o DNA de HPVS de alto e baixo risco, dos seguintes tipos: baixo risco – 6, 11, 42, 43, 44, alto risco - 16, 18, 31, 33, 35,39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68. O Digene® é um teste que utiliza a hibridização do ácido nucleico para detectar o ácido nucleico com um sinal de amplificação que vai ser detectado por quimioluminescência. A luz emitida foi medida por meio de um luminômetro sendo os resultados expressos em Unidade Relativa de Luz (RLU). O valor da RLU é convertido em proporção pelo valor do *Cutoff* (5000 cópias/mL). A análise foi qualitativa e quantitativa, sendo que esta última é expressa em RLU e sugere a carga viral. Cada teste foi processado com controles positivos e negativos em triplicata. O teste foi considerado positivo quando a taxa de unidade de luz relativa para vírus do grupo B (RLU/ PCB) (RLU do espécimen/média da RLU de dois controles positivos) foi igual ou maior que 1.

5.4.2 Reação em cadeia da polimerase

5.4.2.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o kit comercial Puregene[®] Buccal Cell Core Kit A, onde a coleta das células bucais foi realizada com a Escova de Coleta Bucal raspando 10 vezes as áreas da orofaringe correspondentes ao pilar anterior e posterior, amígdalas palatinas, palato mole e base da língua. Para obter melhores resultados a coleta foi sempre realizada 1 hora após o paciente ter ingerido qualquer alimento. As amostras foram armazenadas na Solução de Lise Celular, em tubo de microcentrífuga de 1,5mL, em geladeira, a temperatura de 4°C. O restante da técnica seguiu as seguintes etapas:

- 1 Lise celular completa por meio da adição de 1,5 µL de Puregene Proteinase K (cat. Nº 158918), misturando invertendo 25 vezes e incubando a 55°C durante uma noite.

- 2 Remoção da cabeça da escova da solução de lise celular, raspando nos lados do tubo para recuperar o máximo de líquido possível.
- 3 Adicionar 100 μL de Solução de Precipitação Protéica, e vortexar vigorosamente por 20s em alta velocidade.
- 4 Incubar por 5 minutos no gelo.
- 5 Centrifugar por 3 min em 13.000 a 16.000xg havendo a formação de uma bolinha densa pelas proteínas centrifugadas.
- 6 Pipetar 300 μL de isopropanol e 0,5 μL de Solução Glicogênica (cat. Nº 158930) em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e adicionar o sobrenadante da etapa anterior derramando cuidadosamente.
- 7 Misturar invertendo cuidadosamente 50 vezes.
- 8 Centrifugar por 5 min em 13.000 a 16.000xg.
- 9 Desprezar cuidadosamente o sobrenadante e escorrer o tubo por inversão em um pedaço limpo de papel absorvente, tomando cuidado para que a bolinha densa de proteínas centrifugadas permanecesse no tubo.
- 10 Adicionar 300 μL de etanol 70% e inverter várias vezes para lavar a bolinha densa de proteínas centrifugadas com DNA.
- 11 Centrifugar por 1 min em 13.000 a 16.000xg e posteriormente descartar o sobrenadante cuidadosamente, deixando a bolinha densa de proteínas centrifugadas com DNA secar durante 5 minutos.
- 12 Adicionar 100 μL de Solução de Hidratação de DNA e vortexar por 5 segundos em velocidade média para misturar.
- 13 Incubar à 65°C por 1h para dissolver o DNA.
- 14 Incubar à temperatura ambiente durante a noite, agitando suavemente.
- 15 Centrifugar rapidamente as amostras e transferi-las para um tubo de armazenamento a -20°C.

5.4.2.2 Quantificação, pureza e rendimento do DNA

A medida quantitativa do DNA foi feita com o espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany),

no qual foi feita a medida da absorbância (A) que consiste na medida dos comprimentos de onda de 260 e 280nm. Para tal, foram diluídos 4 µL de cada amostra (soluto) em 196 µL de tampão solvente (Tampão TE: Tris 10 mM, etilenodiamino tetra-acético – EDTA 1 mM, pH 8,0).

Posteriormente foi feita a padronização da concentração utilizando a seguinte fórmula $C1.V1=C2.V2$ onde C1 é a concentração inicial, V1 é o volume inicial, que é o valor a ser pesquisado, V2 o volume final que queremos obter e C2 é a concentração final. A padronização da concentração foi feita para 10ng/ µL. Pela análise espectrofotométrica determinou-se a quantidade, o grau de pureza e o rendimento do DNA de cada amostra coletada.

5.4.2.3 Qualidade do DNA

A qualidade e a integridade do DNA extraído foi avaliada nas 50 primeiras amostras, utilizando o padrão de amplificação do gene da beta globina (β globina), seguindo a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase descrito por Saiki et al (1988). Utilizou-se o conjunto de iniciadores, os primers beta-globina Forward (Fwv) e Reverse (Rev), no volume de 1,25 µL de cada primer, 5 µL da amostra do DNA extraído de cada caso, 12,5 µL de solução de Master Mix (PCR Master Mix 2x, Fermentas Life Sciences, CAN) e 5 µL de água (Water Nuclease-Free, Fermentas Life Sciences, CAN). Foi adicionado um controle negativo, sem amostra de DNA e um controle positivo com amostra do DNA, sob as mesmas condições da reação. A sequência dos primers e o tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Sequência gênica dos primers Forward (F) e Reverse (R) para detectar a β globina

Gene	Sequência (5'-3')	Tamanho (bp*)
	F-AGGTACGGCTGTCATCACTT	
β globina		268
	R-CCTCACCACTTCATCC	

bp* - pares de bases

O PCR foi realizado em um aparelho termociclador (Peltier Thermo Cycle, Nova Instruments, USA). O ciclo realizado consistia em: desnaturação inicial a 95^o por 10 minutos seguido de 34 ciclos compostos por 30 segundos a 94^oC para a nova desnaturação, 30 segundos a 56^oC para o anelamento, 30 segundos a 72^oC para a extensão e 5 minutos a 72^oC para a extensão final.

Finalmente o produto do PCR de cada amostra foi analisado em um gel de agarose a 2%, pela técnica de eletroforese. Esta técnica consiste em separar as moléculas por meio da aplicação de uma diferença de potencial, usando o gel de agarose e os eletrodos. A diferença de potencial entre os eletrodos vai fazer com que as moléculas sejam separadas de acordo com os seus tamanhos, onde as moléculas de menor massa vão migrar mais rapidamente do que aquelas com maior massa.

5.4.2.4 Detecção do HPV

A detecção do HPV foi feita pela técnica do PCR descrita por Husman et al, 1995, utilizando a sequência de primers GP5⁺/6⁺ que amplifica a sequência gênica conservada na região L1 do genoma do HPV (**Tabela 3**). O sistema GP5⁺/6⁺ detecta os HPVs de baixo risco 6, 11, 40, 42, 43, 44 e os de alto risco 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 (Husman et al, 1995; Jacobs et al, 1997).

Para o PCR foi utilizado um mix contendo 1,25 μ L de GP5⁺, 1,25 de GP6⁺, 5 μ L de água, 12,5 μ L de solução de Master Mix (PCR Master Mix 2x, Fermentas Life

Sciences, CAN) e 5 µL de DNA da amostra de cada caso. Um controle negativo sem amostra do DNA e um controle positivo com amostra do DNA foram adicionados. A sequência do primer e o tamanho dos fragmentos dos pares de base são apresentados na **tabela 3**.

Tabela 3. Sequência de primers usados para detectar o HPV

Região Gênica	Primers	Sequência (5'-3')	Tamanho (bp*)
	GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC-3'	
L1			150
	GP6+	5'-GAAAAATAAACTTGTAATCATATTC-3'	

bp* - pares de bases

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.5.1 Análise de Regressão Logística

O software utilizado em toda análise estatística foi o SPSS®, versão 22 sendo o nível de significância considerado em 5% ($p=0,05$). Foram realizadas três regressões logísticas binárias múltiplas para os dados amostrados usando como variáveis respostas HPV, HPV Alto Risco e HPV Baixo Risco. A função de ligação utilizada foi o logito. Foram escolhidas as 10 principais variáveis explicativas (Lesão Oral Evidente, contagem de CD4⁺, Tempo de Infecção, Utilização da Terapia ARV, Coito Anal, Coito Oral, Uso de Preservativo, Opção Sexual, Número de Parceiros, Fumo) para o modelo e depois foi utilizada uma técnica estatística de seleção de variáveis baseada na retirada das mesmas (método da razão de verossimilhança). A significância dos parâmetros da regressão foi testada pelo teste estatístico de Wald, sendo o nível de significância considerado em 5% ($p=0,05$).

5.5.2 Análise de associação

O software utilizado em toda análise estatística foi o SPSS®, versão 22 sendo o nível de significância considerado em 5% ($p=0,05$). Foram realizados diversos testes estatísticos de associação a fim de avaliar a relação entre as variáveis: HPV, HPV Alto Risco e HPV Baixo Risco e as diversas outras variáveis deste estudo (Idade, Gênero, Lesão Oral Evidente, contagem de CD4⁺, Tempo de Infecção, Utilização da Terapia ARV, Uso de Fumo, Álcool, Maconha, Drogas, Coito Oral, Coito Anal, Uso de preservativo, Presença de Doenças Sexualmente Transmissíveis, Opção Sexual, Número de Parceiros e Resultado Citológico). Para avaliar a relação entre HPV, HPV Alto Risco, HPV Baixo Risco e a idade dos pacientes foi realizado o teste t de Student a fim de comparar as médias de idade entre os grupos com e sem HPV. Já para as demais variáveis, foi realizado o teste Qui-quadrado de Pearson para medir a dependência entre cada variável e HPV, HPV Alto Risco, HPV Baixo Risco. Quando o valor esperado em uma célula da tabela de contingência 2x2 foi <5 utilizou-se a Correção de Yates. Em todos os casos que a tabela foi maior que uma tabela 2x2, foi calculada a razão de chance, mas esta só foi considerada significativa quando houve associação entre a variável analisada e o tipo de HPV. Para tabelas maiores que 2x2, cuja célula apresentasse valor esperado <5, foi realizado o teste de Qui-quadrado via simulação de Monte Carlo, com 99% de confiança e 10.000 amostras simuladas. Para avaliar a associação entre os diagnósticos citológicos dos dois observadores que participaram do estudo duplo cego foi realizado o teste McNemar para 2 amostras emparelhadas.

6. RESULTADOS

6.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No total foram avaliados 100 pacientes portadores do HIV, sem queixas de lesões orais. Inicialmente foi aplicado o questionário para análise das seguintes variáveis: idade, gênero, lesão oral evidente, contagem de CD4⁺, tempo de infecção, uso da terapia antirretroviral (TARV), uso de fumo, álcool, maconha ou outras drogas, coito oral e anal, uso de preservativos, opção sexual, número de parceiros, e história de doenças sexualmente transmissíveis, estando a frequência destas variáveis exposta na **Tabela 4**.

Houve predominância do gênero masculino com 68% (68/100) homens e 32% (32/100) mulheres. A idade variou entre 20 e 69 anos, sendo a média±dp de idade de 42,81±10 anos. A faixa etária predominante foi a quinta década (40-49anos) de vida, representando 39% (39/100) da amostra.

As alterações na mucosa de orofaringe foram observadas em 24% (24/100) dos pacientes, sendo estas representadas por edema e hiperemia na maioria dos casos, com área de leucoplasia em três e hipertrofia de amígdalas palatinas em dois.

A maioria dos pacientes, 42,7% (41/96) apresentou contagem de CD4⁺ entre 200 e 500cels/mm³ sendo que 41,7% (40/96) tinham mais do que 500cels/mm³. Os valores mínimo e máximo de CD4⁺ foram 18 e 1411 respectivamente, sendo a média±dp 482,4±276,4. A maioria 38,3% (38/99) dos pacientes era portadora do vírus do HIV há mais de 10 anos sendo que 88% (88/99) faziam uso da terapia antirretroviral. Os tempos máximo e mínimo de detecção da infecção foram de 20 anos e 30 dias respectivamente.

Quanto ao uso de cigarro, álcool e outras drogas 36% (36/100) dos pacientes eram fumantes, 64% (64/100) faziam uso do álcool, 17% (17/100) usavam maconha e 10% (10/100) outras drogas ilícitas.

O coito oral foi praticado por 65,3% (64/98) e o anal por 57,6% (57/99) dos pacientes sendo que 63,9% (63/97) usavam preservativo. Tanto os homo como os heterossexuais tiveram igual frequência, quanto a opção sexual 40%(40/100), sendo

que 20% (20/100) dos pacientes eram bissexuais. Quanto ao número de parceiros 51,5% (51/99) dos pacientes tinham mais do que um parceiro por ano e 49% (49/100) tiveram doença sexualmente transmissível (DST).

Tabela 4. Distribuição de frequência das variáveis clínicas na população estudada

Dados Clínicos	Número de Pacientes	(%)
Gênero		
Homens	68	68(68/100)
Mulheres	32	32(32/100)
Idade a		
20 – 29	13	13(13/100)
30 – 39	21	21(21/100)
40 – 49	39	39(39/100)
50 – 59	23	23(23/100)
60 – 69	4	4(4/100)
LOE		
Presente	24	24(24/100)
Ausente	76	76(76/100)
CD4⁺ /mm³		
<200	15	15,6(15/96)
200 – 500	41	42,7(41/96)
>500	40	41,7(40/96)
TI a		
≤1	15	15,2(15/99)
2 – 5	21	21,2(21/99)
6 – 10	25	25,3(25/99)
>10	38	38,4(38/99)
TARV		
Sim	88	88(88/100)
Não	12	12(12/100)
Fumo		
Sim	36	36(36/100)
Não	64	64(64/100)
Alcool		
Sim	64	64(64/100)
Não	36	36(36/100)
Maconha		
Sim	17	17(17/100)
Não	83	83(83/100)
Outras drogas		
Sim	10	10(10/100)
Não	90	90(90/100)
CO		
Sim	64	65,3(64/98)
Não	34	34,7(34/98)

.(cont.)

Tabela 4. Distribuição de frequência das variáveis clínicas na população estudada (cont.)

Dados Clínicos	Número de Pacientes	(%)
CA		
Sim	57	57,6(57/99)
Não	42	42,4(42/99)
UP		
Sim	62	63,9(63/97)
Não	35	36,1(36/97)
OS		
Homo	40	40(40/100)
Bi	40	40(40/100)
Hetero	20	20(20/100)
NP/ano		
1	14	14,1(14/99)
>1	51	51,5(51/99)
<1	34	34,3(34/99)
DSTs		
Sim	49	49(49/100)
Não	51	51(51/100)
Exame citológico		
IL	73	73(73/100)
IM	18	18(18/100)
II	7	7(7/100)
AS-CUS	2	2(2/100)

Idade A – idade em anos; **LOE** – lesão oral evidente; **Tia** – tempo de infecção em anos; **TRAV** – terapia antirretroviral; **CA** – coito anal; **CO** – coito oral; NP/ano – número de parceiros por ano; **OS** – opção sexual; **homo** – homossexual; **hero** – heterossexual; **bi**-bissexual; **NP/a** – n0 parceiros por ano; **DST** - doenças sexualmente transmissíveis; **IL** – inflamatório leve; **IM** – inflamatório moderado; **II** – inflamatório intenso.

Dentre os 98 pacientes que praticavam coito oral quinze apresentaram lesões orais ao exame oroscópico (**Tabela 5**), somente 2 com níveis de CD4⁺ abaixo de 200cels/mm³ (**Tabela 6**). Estas lesões foram representadas por hipertrofia e hiperemia de amígdalas palatinas, pequena lesão nodular em epiglote e área leucoplásica em pilar anterior. O exame citológico destas lesões não revelou nenhuma alteração atípica.

Tabela 5 – Relação entre coito oral e lesão oral evidente

		COITO ORAL		Total
		SIM	NÃO	
LOE	SIM	15	8	23
	NÃO	49	26	75
Total		64	34	98

LOE – lesão oral evidente

Tabela 6 – Relação entre CD4⁺ e lesão oral evidente

		CD4 ⁺			Total
		<200	200-500	>500	
LOE	SIM	2	11	10	23
	NÃO	13	30	30	73
Total		15	41	40	96

LOE – lesão oral evidente

6.2 RESULTADOS DOS EXAMES CITOLÓGICO E IMUNOCITOQUÍMICO

Na citologia convencional, dentre as 100 amostras examinadas por 2 observadores, houve discordância em quatro, onde o diagnóstico de ASC-US era uma das opções (**Tabela 7**). Após a revisão, dentre os dois casos diagnosticados pelo observador 1, em um o diagnóstico de ASC-US foi mantido, enquanto que no outro concluiu-se que as alterações celulares caracterizavam uma inflamação moderada acometendo tanto células escamosas como glandulares. Quanto aos casos discordantes do observador 2, em um o diagnóstico de ASC-US foi mantido, enquanto que no outro concluiu-se que a presença da paraceratose atípica observada isoladamente, sem outros achados, não era suficiente para fechar como ASC-US, ficando com o diagnóstico de processo inflamatório moderado. Os critérios necessários para concluir como ASC-US foram: alteração da relação núcleo/citoplasma, pleomorfismo nuclear, discreto hiperchromatismo com irregularidade da membrana nuclear e paraceratose atípica (**Figura 10 A, B, C e D**).

Tabela 7. Resultados dos exames citológicos pelos métodos da citologia convencional e meio líquido segundo os observadores

A	Citologia convencional			Citologia em Meio Líquido		Amostra	Citologia convencional		Citologia em Meio Líquido	
	Obs1	Obs 2	Revisão	Obs 1	Obs 2		Obs 1	Obs 2	Obs 1	Obs2
01	IL	IL		IL	IL	51	IL	IL	-	-
02	IL	IL		IM	IL	52	IM	IL	-	-
03	IM	IL		IM	IL	5	IL	IL	-	-
04	ASC-US	IL	IM	IL	IL	54	IL	IL	-	-
05	IL	IL		IM	IL	55	IM	IL	-	-
06	IM	IL		IL	IL	56	IL	IL	IL	IM
07	IM	IL		IL	IL	57	IM	IL	IL	IL
08	-	-		IL	IL	58	IL	IL	IL	IL
09	IL	IL		IL	IL	59	IL	IL	-	IL
10	IL	IL		IL	IL	60	IL	IL	-	-
11	IM	IL		IL	IL	61	IL	IL	IL	IL
12	IL	IL		IL	IL	62	IL	IL	-	IL
13	II	IM		IM	IM	63	IL	IL	IL	IL
14	IL	IL		IL	IL	64	IL	IL	IL	IM
15	IL	IL		IL	IL	65	IL	IL	IL	IL
16	ASC-US	IL	ASC-US	IL	IL	66	IM	IL	IL	IL
17	IL	IL		IL	IL	67	-	IL	IL	IM
18	IL	IL		IL	IL	68	IL	IL	N	IL
19	IM	IL		IL	IL	69	IL	IL	N	IM
20	IM	IL		IL	IL	70	IL	IL	IL	IM
21	IM	IL		IL	IL	71	IL	IL	IL	IL
22	IL	IL		IL	IL	72	IL	IL	IM	IM
23	IM	IL		IL	IL	73	IL	IL	IM	IM
24	II	IL		IL	IL	74	IL	IL	IM	IM
25	IL	IL		IL	IL	75	IL	IL	IM	IL
26	IL	IL		IM	IL	76	IL	IL	IL	IL
27	IL	IL		IL	IL	77	IL	IL	IL	IM
28	IL	IL		IL	IL	78	IL	IL	IL	IL
29	IL	IL		IM	IL	79	IL	IL	IL	IL
30	IL	IL		IM	IL	80	IM	IL	IL	IL
31	IL	IL		IL	IL	81	IM	IL	IL	IL
32	IL	IL		IL	IL	82	IM	IL	IL	IL
33	IL	IL		IL	IL	83	II	IL	IL	N
34	IL	IL		IL	IL	84	IM	IL	IL	IL
35	IM	IL		IL	IL	85	IM	IL	-	-
36	IM	ASC-US	IM	IL	IL	86	IM	IL	IL	IL
37	IL	IL		IL	IL	87	IM	IL	IL	IL
38	IL	IL		IL	IL	88	IM	IL	IL	IL
39	IL	IL		IL	IL	89	IL	IL	IL	IL
40	IL	IL		IL	IL	90	IL	IL	N	N

(cont.)

Tabela 7. Resultados dos exames citológicos pelos métodos da citologia convencional e meio líquido segundo os observadores (cont.)

A	Citologia convencional			Citologia em Meio Líquido		Amostra	Citologia convencional		Citologia em Meio Líquido	
	Obs1	Obs 2	Revisão	Obs 1	Obs 2		Obs 1	Obs 2	Obs 1	Obs2
41	IL	ASC-US	ASC-US	IL	IM	91	IM	IL	IL	N
42	IL	IL		IL	IL	92	IL	IL	IL	IL
43	IL	IL		IL	IL	93	IL	IL	IL	IL
44	IL	IM		IL	IM	94	IL	IL	IL	N
45	IL	IL		IL	IL	95	IM	IL	IL	IL
46	IL	IM		IL	IM	96	IL	IL	IL	N
47	IL	IL		IL	IL	97	IL	IL	IL	N
48	IL	IL		IL	IL	98	IM	IL	IL	IL
49	IM	IL		IL	IL	99	IM	IL	IL	IL
50	IL	IL		IL	IL	100	IM	IL	IL	IL

A – amostra; N = normal; IL = inflamação leve; IM = inflamação moderada; II = inflamação intensa; ASC-US = atipias de significado indeterminado; Obs = observador; - = exames que não foram realizados.

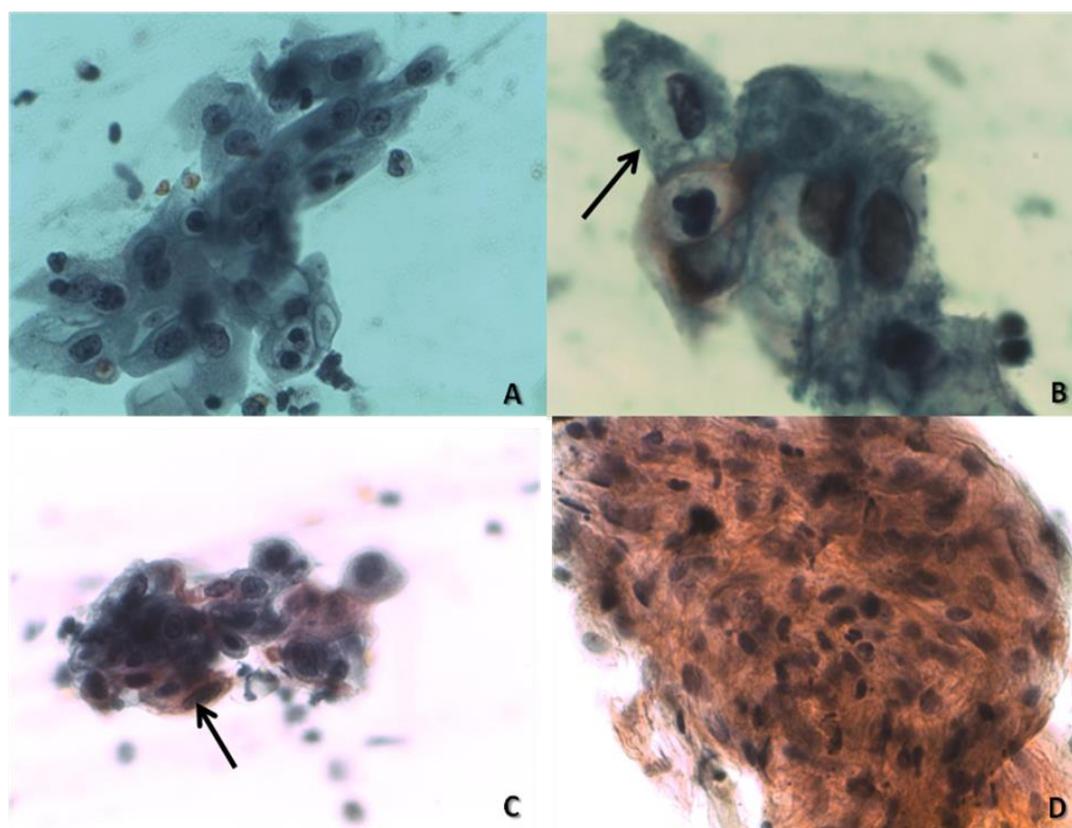


Figura 10. ASC-US. **A** – Pleomorfismo e hiper cromatismo nuclear. **B** – Alteração da relação núcleo/citoplasma. **C** – Pleomorfismo e hiper cromatismo nuclear com ceratinização de células (seta). **D** – Paraceratose atípica. Papanicolaou 400x.

Em 96 amostras houve concordância entre os dois observadores quanto ao diagnóstico de processo inflamatório. Houve ligeira discordância quanto a intensidade do processo inflamatório. Os critérios utilizados para diagnosticar as alterações inflamatórias foram representados pela presença de infiltrado inflamatório (**Figura 11A**), halo claro péri-nuclear (**Figura 11B**), metacromasia citoplasmática (**Figura 11C**), binucleação (**Figura 11D**) e vacuolização citoplasmática (**Figura 11C**).

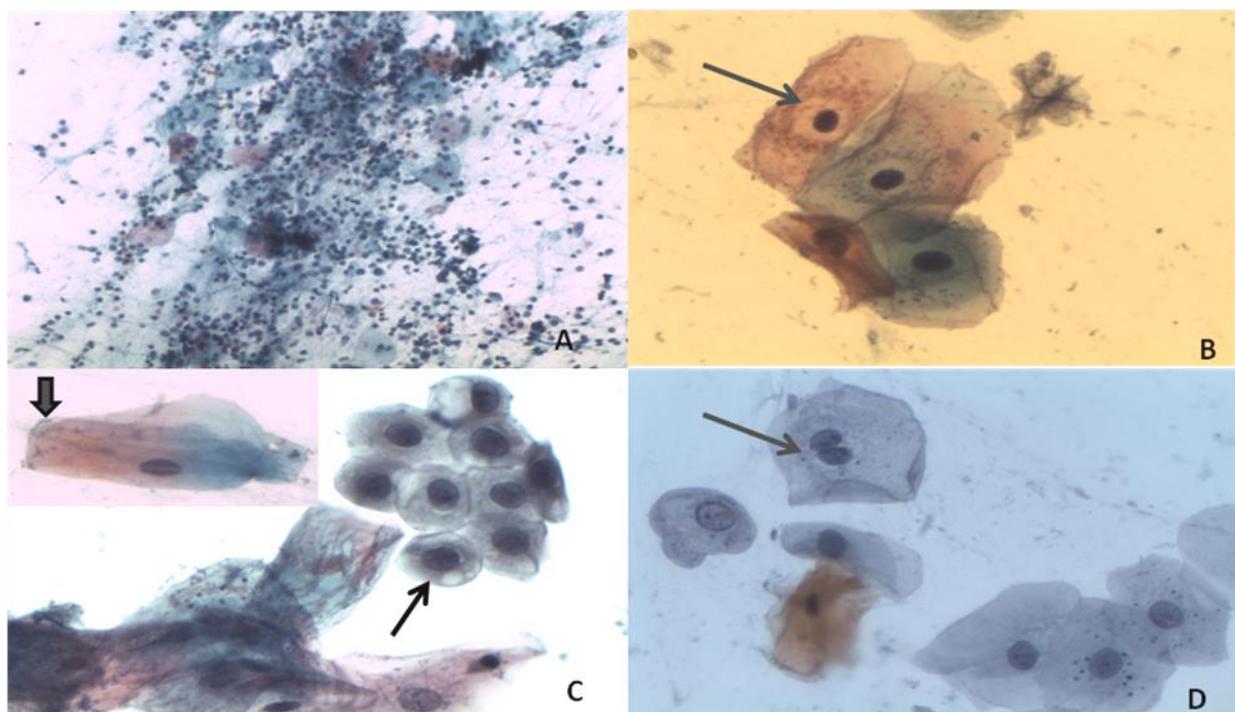


Figura 11. Alterações inflamatórias. **A** – Esfregaço com infiltrado inflamatório intenso. Papanicolaou 100x. **B** – Halo claro péri-nuclear. Papanicolaou 400x. **C** – Vacuolização citoplasmática. Papanicolaou 400x. **D** – Binucleação. Papanicolaou 400x.

A microbiota caracterizou-se pela presença de *Cândida sp.*, actinomyces, bacilos e cocos (**Figura 12**). Em alguns casos a presença de *Cândida sp.* causou alterações inflamatórias um pouco mais intensas, com discreto grau de hiperchromatismo nuclear e halo péri-nuclear mais definido (**Figura 13**).

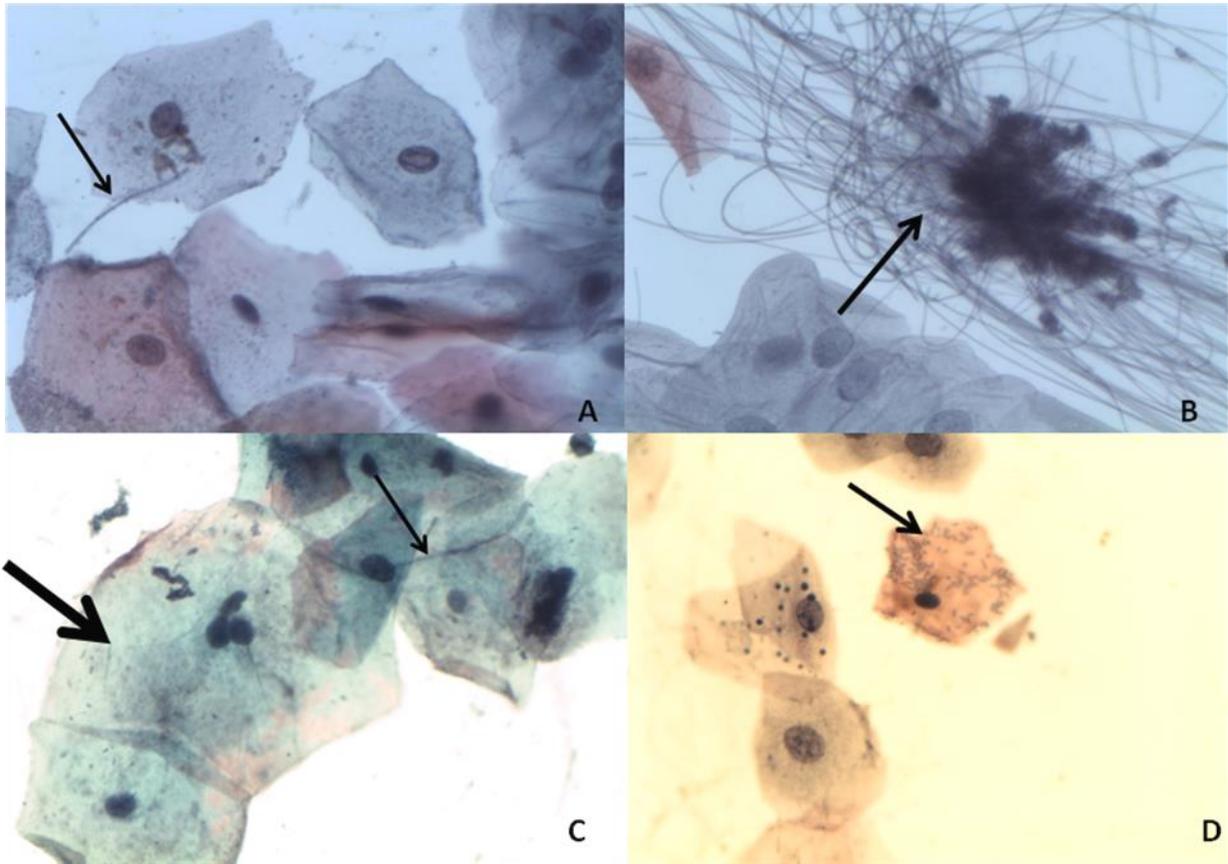


Figura 12. Flora. **A** – Hifas de *Cândida sp.* (seta). **B**- *Actinomyces*. **C** - *Coccobacillus* (seta grossa) e hifas de *Cândida SP.* (seta fina). **D** – Microbiota bacteriana – *Coccobacillus* (seta). Papanicolaou 400x.

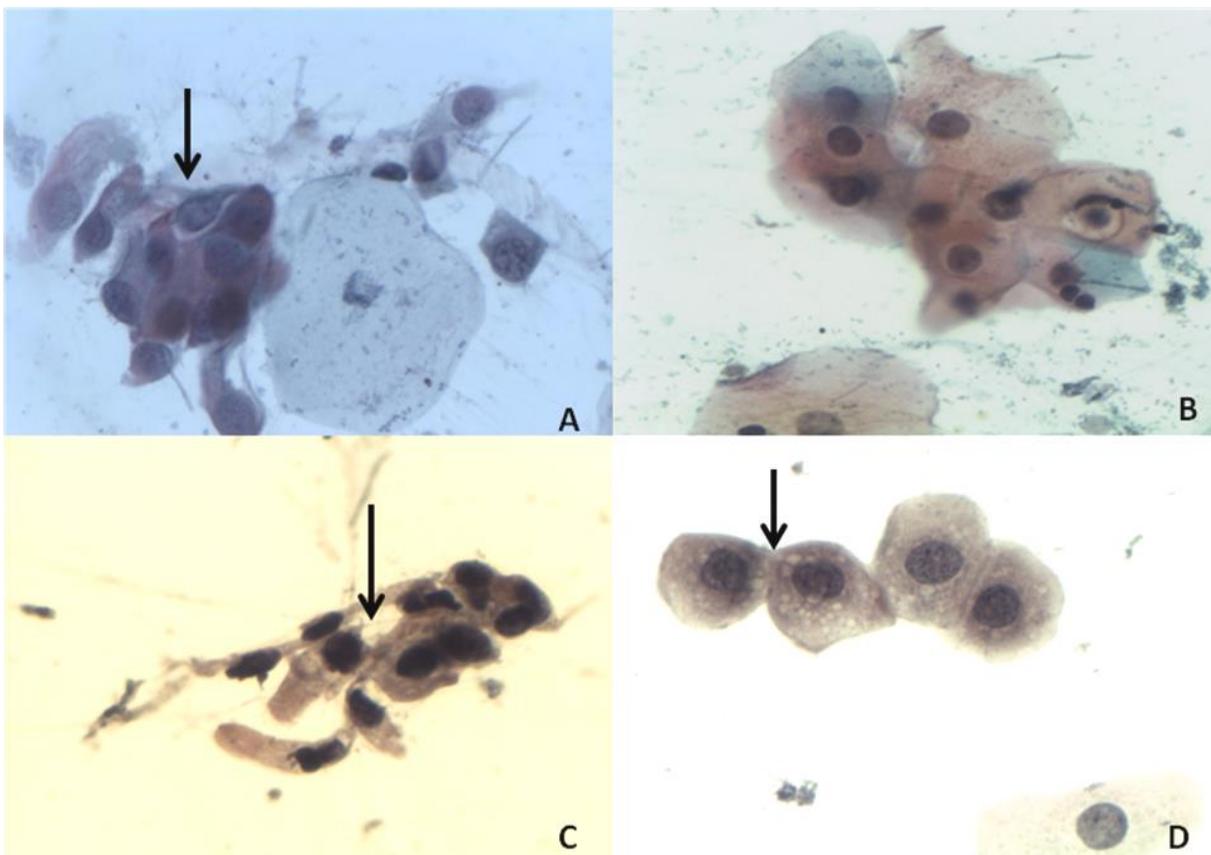


Figura 13. Alterações celulares causadas pela *Cândida sp.* **A e C** – Alterações nucleares em células glandulares. **B** – Alterações nucleares em células epidérmicas. **D** – Presença de células profundas. Papanicolaou 400x.

Foram examinadas 93 citologias em meio líquido, as quais apresentaram somente alterações inflamatórias inespecíficas sendo que em alguns casos não foi observada nenhuma alteração inflamatória. Não foram observadas alterações inflamatórias intensas ou atipias (**Tabela 7**).

A pesquisa da expressão da proteína p16INK4a feita pelo estudo imunocitoquímico não revelou marcação nuclear ou citoplasmática em nenhum dos 100 casos examinados.

6.3 RESULTADOS DA CAPTURA HÍBRIDA

Com o método da captura híbrida foi pesquisado HPV de alto risco em 98 amostras enquanto que o HPV de baixo risco foi pesquisado em somente 48 amostras.

A captura híbrida foi considerada positiva quando a unidade relativa de luz (RLU) cutoff (CO) foi maior do que um ($RLU/CO \geq 1$). Em 14 amostras a captura híbrida foi positiva sendo 8 para HPV de alto risco e 8 para HPV de baixo risco, representando respectivamente 8,2% e 16,7% ($8/98$ alto risco e $8/48$ baixo risco). Em duas amostras houve positividade para HPV de alto e baixo risco na mesma amostra. Nas amostras com HPV de alto risco e baixo risco, a média \pm dp (máximo-mínimo) da relação RLU/CO (estimativa da carga viral) foi, respectivamente, $2,9 \pm 2,58$ (1,09 - 7,87) e $1,61 \pm 0,65$ (1,07 - 2,68). Em dois casos (16 e 46) houve positividade para HPV de alto e baixo risco na mesma amostra (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Estudo Molecular – PCR e Captura Híbrida. Valores da RLU/CO obtidos na captura híbrida para HPV de alto e baixo risco

Amostra	Captura Híbrida		PCR	Amostra	Captura Híbrida	
	Baixo Risco	Alto			Alto Risco	PCR
01	0.09	0.23	NEGATIVO	51	0,60	NEGATIVO
02	0.08	0.17	NEGATIVO	52	0,56	NEGATIVO
03	0.05	0.29	NEGATIVO	53	0,87	NEGATIVO
04	0.38	0.23	NEGATIVO	54	0,45	NEGATIVO
05	0.35	0.16	NEGATIVO	55	0,85	NEGATIVO
06	0.15	0.48	NEGATIVO	56	0,69	NEGATIVO
07	0.07	0.21	NEGATIVO	57	0,72	NEGATIVO
08			NEGATIVO	58	0,71	NEGATIVO
09	1.91	0.16	NEGATIVO	59	0,84	NEGATIVO
10	0.05	0.24	NEGATIVO	60	0,63	NEGATIVO
11	0.21	0.33	NEGATIVO	61	0,56	NEGATIVO
12	0.26	0.53	NEGATIVO	62	0,60	NEGATIVO
13	0.07	0.15	NEGATIVO	63	0,58	NEGATIVO
14	0.09	0.28	NEGATIVO	64	0,52	NEGATIVO
15	0.18	0.18	NEGATIVO	65	0,50	NEGATIVO

(Cont.)

Tabela 8 – Estudo Molecular – PCR e Captura Híbrida. Valores da RLU/CO obtidos na captura híbrida para HPV de alto e baixo risco (cont.)

Amostra	Captura Híbrida		PCR	Amostra	Captura Híbrida	
	Baixo Risco	Alto			Alto Risco	PCR
16	2.68	1.30	NEGATIVO	66	0,47	NEGATIVO
17	0.11	0.17	NEGATIVO	67	0,50	NEGATIVO
18	0.52	0.37	NEGATIVO	68	0,50	NEGATIVO
19	0.10	0.62	NEGATIVO	69	0,41	NEGATIVO
20	0.42	0.16	NEGATIVO	70	0,43	NEGATIVO
21	1.08	0.20	NEGATIVO	71	0,45	NEGATIVO
22	1.21	0.57	NEGATIVO	72	0,50	NEGATIVO
23	0.34	0.20	NEGATIVO	73	0,60	NEGATIVO
24	0.18	0.29	NEGATIVO	74	0,69	NEGATIVO
25	0.10	0.22	NEGATIVO	75	0,56	NEGATIVO
26	0,46	0,38	NEGATIVO	76	0,65	NEGATIVO
27	0,88	0,56	NEGATIVO	77	0,47	NEGATIVO
28			NEGATIVO	78	0,63	NEGATIVO
29	0,94	0,37	NEGATIVO	79	0,52	NEGATIVO
30	0,60	1,47	NEGATIVO	80	0,52	NEGATIVO
31	2,46	0,25	NEGATIVO	81	0,54	NEGATIVO
32	0,11	0,21	NEGATIVO	82	0,69	NEGATIVO
33	1,47	0,41	NEGATIVO	83	0,65	NEGATIVO
34	0,39	7,87	NEGATIVO	84	0,58	NEGATIVO
35	0,45	3,17	NEGATIVO	85	0,52	NEGATIVO
36	0,04	0,22	NEGATIVO	86	0,69	NEGATIVO
37	0,52	1,47	NEGATIVO	87	0,63	NEGATIVO
38	0,11	0,15	NEGATIVO	88	0,63	NEGATIVO
39	0,23	0,79	NEGATIVO	89	0,69	NEGATIVO
40	0,18	0,38	NEGATIVO	90	0,61	NEGATIVO
41	0,41	0,18	NEGATIVO	91	0,58	NEGATIVO
42	0,35	0,98	NEGATIVO	92	0,69	NEGATIVO
43	1,07	0,45	NEGATIVO	93	0,76	NEGATIVO
44	0,34	0,72	NEGATIVO	94	0,80	NEGATIVO
45	0,47	1,26	NEGATIVO	95	0,84	NEGATIVO
46	1,07	1,09	NEGATIVO	96	0,74	NEGATIVO
47	0,05	5,96	NEGATIVO	97	0,63	NEGATIVO
48	0,03	0,21	NEGATIVO	98	0,63	NEGATIVO
49	0,60	0,23	NEGATIVO	99	0,84	NEGATIVO
50	0,37	0,23	NEGATIVO	100	0,93	NEGATIVO

Foi feita a regressão logística e avaliação da associação entre indivíduos infectados e não infectados pelo HPV e as variáveis clínicas (gênero, idade dos pacientes em anos, lesão oral evidente, contagem de CD4⁺/mm³, tempo de infecção pelo HIV em anos, uso de TARV, fumo, álcool, outras drogas, coito oral, coito anal, uso de preservativos, opção sexual, número de parceiros, DSTs). A análise foi feita inicialmente para o HPV e, posteriormente, para os HPVs de alto e baixo risco isoladamente (**Tabela 8, 9, 10, 11**).

Tabela 9. Análise estatística da associação entre o HPV, HPV de alto risco e HPV de baixo risco com as variáveis clínicas estudadas.

Variáveis clínicas	Infecção pelo HPV na cavidade oral										
	TOTAL		HPV			HPV Alto risco			HPV Baixo risco		
	Nt	n (%)	n (%)	RC (IC 95%)	P	n (%)	RC (IC 95%)	P	n (%)	RC (IC 95%)	P
Gênero											
Homens	68	56 (82.4)	10 (14.7)	1.00	-	5 (7.3)	1.00	-	7 (10.3)	1.00	-
Mulheres	32	28 (87.5)	4 (12.5)	0.80 (0.23-2.78)	0.965	3 (9.4)	1.26 (0.28-5.65)	1.000	1 (3.1)	0.33 (0.04-3.01)	0.561
Idade A											
20 – 29	13	10 (76.9)	3 (23.1)	1.00	-	2 (16.7)	1.00	-	2 (16.7)	1.00	-
30 – 39	21	18 (85.7)	3 (14.3)	0.55 (0.09-3.29)	0.849	2 (9.5)	0.58 (0.07-4.72)	1.000	1 (4.8)	0.28 (0.02-4.24)	0.778
40 – 49	39	33 (84.6)	6 (15.4)	0.61 (0.13-2.87)	0.832	3 (7.7)	0.46 (0.07-3.10)	0.786	4 (10.2)	0.40 (0.05-2.98)	0.732
50 – 59	23	20 (86.9)	2 (8.7)	0.33 (0.05-2.33)	0.520	1 (4.3)	0.26 (0.02-3.22)	0.630	1 (4.3)	0.29 (0.02-4.24)	0.778
60 – 69	4	3 (75.0)	0 (0.0)	-	0.918	0 (0.0)	-	1.000	0 (0.0)	-	1.000
LOE											
Ausente	76	66 (86.8)	9 (11.8)	1.00	-	4 (5.3)	1.00	-	5 (6.6)	1.00	-
Presente	24	18 (75.0)	5 (20.8)	2.04 (0.61-6.84)	0.408	4 (16.7)	3.74 (0.85-16.34)	0.158	3 (12.5)	1.58 (0.32-7.76)	0.887
CD4+ /mm³											
<200	15	13 (86.7)	2 (13.3)	1.00	-	2 (13.3)	1.00	-	0 (0.0)	1.00	-
200 – 500	41	36 (87.8)	5 (12.2)	0.90 (0.16-5.24)	1.000	3 (7.3)	0.51 (0.07-3.42)	0.865	3 (7.3)	-	0.544
>500	40	31 (77.5)	7 (17.5)	1.47 (0.27-8.03)	0.969	3 (7.5)	0.56 (0.08-3.72)	0.929	5 (12.5)	-	0.220
Tia											
≤1	15	11 (73.3)	4 (26.7)	1.00	-	2 (13.3)	1.00	-	2 (13.3)	1.00	-
2 – 5	21	18 (85.7)	3 (14.3)	0.46 (0.08-2.44)	0.618	2 (9.5)	0.68 (0.08-5.49)	1.000	1 (4.8)	0.17 (0.01-2.56)	0.494
6 – 10	25	21 (84.0)	2 (8.0)	0.26 (0.04-1.66)	0.303	2 (8.0)	0.62 (0.08-2.95)	1.000	1 (4.0)	0.12 (0.01-1.88)	0.347
>10	38	33 (86.8)	5 (13.2)	0.42 (0.09-1.83)	0.439	2 (5.3)	0.36 (0.05-2.83)	0.671	4 (10.5)	0.40 (0.05-3.27)	0.772
TARV											
Não	12	8 (66.7)	4 (33.3)	1.00	-	3 (25.0)	1.00	-	2 (16.7)	1.00	-
Sim	88	76 (86.4)	10 (11.4)	0.26 (0.07-1.03)	0.116	5 (5.7)	0.18 (0.04-0.91)	0.087	6 (6.8)	0.64 (0.11-3.84)	1.000

(Cont.)

Tabela 9. Análise estatística da associação entre o HPV, HPV de alto risco e HPV de baixo risco com as variáveis clínicas estudadas (cont.).

Variáveis clínicas	Infecção pelo HPV na cavidade oral										
	TOTAL			HPV		HPV Alto risco			HPV Baixo risco		
	Nt	n (%)	n (%)	RC (IC 95%)	P	n (%)	RC (IC 95%)	P	n (%)	RC (IC 95%)	P
Fumo											
Não	64	50 (78.1)	13 (20.3)	1.00	-	7 (10.9)	1.00	-	8 (12.5)	1.00	-
Sim	36	34 (94.4)	1 (2.7)	0.11 (0.014-0.91)	0.016	1 (2.7)	0.24 (0.03-1.99)	0.296	0 (0.0)	-	0.180
Álcool											
Não	36	30 (83.3)	6 (16.7)	1.00	-	2 (5.6)	1.00	-	5 (13.9)	1.00	-
Sim	64	54 (84.4)	8 (12.5)	0.74 (0.24-2.34)	0.608	6 (9.4)	1.82 (0.35-9.54)	0.737	3 (4.7)	0.36 (0.07-1.73)	0.359
Maconha											
Não	83	69 (83.1)	12 (14.4)	1.00	-	7 (8.4)	1.00	-	7 (8.4)	1.00	-
Sim	17	15 (88.2)	2 (11.8)	0.77 (0.15-3.79)	1.000	1 (5.9)	0.66 (0.08-5.75)	1.000	1 (5.9)	1.76 (0.16-19.48)	1.000
Outras drogas											
Não	90	74 (82.2)	14 (15.5)	1.00	-	8 (8.9)	1.00	-	8 (8.9)	1.00	-
Sim	10	10 (100.0)	0 (0.0)	-	0.376	0 (0.0)	-	0.700	0 (0.0)	-	1.000
CO											
Não	34	29 (85.3)	4 (11.8)	1.00	-	2 (5.9)	1.00	-	2 (5.9)	1.00	-
Sim	64	53 (82.8)	10 (15.6)	1.37 (0.39-4.75)	0.849	6 (9.4)	1.63 (0.31-8.57)	0.846	6 (9.4)	2.71 (0.49-15.10)	0.435
CA											
Não	42	36 (85.7)	5 (11.9)	1.00	-	2 (4.8)	1.00	-	3 (7.1)	1.00	-
Sim	57	47 (82.4)	9 (15.8)	1.38 (0.43-4.47)	0.592	6 (10.5)	2.34 (0.45-12.24)	0.510	5 (8.8)	1.67 (0.35-7.93)	0.796
UP											
Não	35	33 (94.3)	2 (5.7)	1.00	-	2 (5.7)	1.00	-	0 (0.0)	1.00	-
Sim	62	48 (77.4)	12 (19.4)	4.12 (0.87-19.65)	0.058	6 (9.7)	1.83 (0.35-9.62)	0.732	8 (12.9)	-	0.146
OS											
Homo	40	37 (92.5)	3 (7.5)	1.00	-	2 (5.0)	1.00	-	2 (5.0)	1.00	-
Hetero	40	32 (80.0)	7 (17.5)	2.70 (0.64-1.31)	0.290	4 (10.0)	2.17 (0.37-12.60)	0.648	3 (7.5)	0.33 (0.05-2.45)	0.598
Bi	20	15 (75.0)	4 (20.0)	3.29 (0.66-16.50)	0.283	2 (10.0)	2.24 (0.29-17.22)	0.814	3 (15.0)	1.29 (0.16-10.45)	1.000

(cont.)

Tabela 9. Análise estatística da associação entre o HPV, HPV de alto risco e HPV de baixo risco com as variáveis clínicas estudadas (cont.)

Variáveis clínicas	Infecção pelo HPV na cavidade oral										
	TOTAL		n (%)	HPV		HPV Alto risco			HPV Baixo risco		
	Nt	n (%)		RC (IC 95%)	P	n (%)	RC (IC 95%)	P	n (%)	RC (IC 95%)	P
OS (Mulheres)											
Homo	19	19 (100.0)	0 (0.0)	1.00	-	0 (0.0)	1.00	-	0 (0.0)	1.00	-
Heter	13	9 (69.2)	4 (30.8)	-	0.041	3 (23.1)	-	0.114	1 (7.7)	-	-
Bi	0	0 (0.0)	0 (0.0)	-	-i	0 (0.0)	-	-	0 (0.0)	-	-
NP/ano											
<1	34	23 (67.6)	10 (29.4)	1.00	-	7 (20.6)	1.00	-	5 (14.7)	1.00	-
1	14	11 (78.6)	3 (21.4)	0.63 (0.142-75)	0.791	1 (7.1)	0.29 (0.03-2.57)	0.454	2 (14.3)	1.60 (0.25-10.05)	1.000
>1	51	49 (96.1)	1 (1.9)	0.05 (0.01-0.39)	0.001	0 (0.0)	-	0.003	1 (2.0)	1.40 (0.13-15.26)	1.000
NP/ano											
<10	53	46 (86.8)	6 (11.3)	1.00	-	4 (7.5)	1.00	-	2 (3.8)	1.00	-
>10	44	36 (81.8)	7 (15.9)	1.49 (0.46-4.83)	0.503	4 (9.1)	1.23 (0.29-5.23)	1.000	5 (11.3)	4.29 (0.73-25.00)	0.198
NP/ano											
<4	34	28 (82.4)	5 (14.7)	1.00	-	4 (20.6)	1.00	-	1 (2.9)	1.00	-
>4	64	54 (84.4)	9 (14.1)	0.93 (0.28-3.05)	1.000	4 (7.1)	0.49 (0.11-2.10)	0.560	7 (10.9)	7.75 (0.87-71.43)	0.093
DSTs											
Não	51	43 (84.3)	8 (15.7)	1.00	-	5 (9.8)	1.00	-	5 (9.8)	1.00	-
Sim	49	41 (83.7)	6 (12.2)	0.79 (0.25-2.46)	0.680	3 (6.1)	0.63 (0.14-2.78)	0.804	3 (6.1)	0.90 (0.19-4.30)	1.000

Idade A – idade em anos; **LOE** – lesão oral evidente; **Tia** – tempo de infecção em anos; **TRAV** – terapia antirretroviral; **CA** – coito anal; **CO** – coito oral; **UP** – uso preservativo; **RC** – razão de chance; **Nt** – n^o total; **NP/ano** – número de parceiros por ano; **OP** – opção sexual; **homo** – homossexual; **hero** – heterossexual; **bi**-bissexual; **DST** - doenças sexualmente transmissíveis.

Ao ser feita a regressão logística ou a associação observa-se que não houve associação entre as variáveis: gênero, idade dos pacientes (anos), lesão oral evidente, uso TARV, outras drogas, coito oral/anal, uso de preservativos, DSTs e os indivíduos infectados pelo HPV e HPVs de alto e baixo risco (**Tabela 9,10,11 e 12**).

No modelo ajustado para o **HPV** como um todo apenas uma variável, o fumo ($p \leq 0,034$), além da constante, foram significativas ao nível de significância de 5%. Como a regressão logística permite o cálculo da razão de chance de cada variável no modelo, que é equivalente ao exponencial de cada parâmetro (β_i), pode-se concluir que neste estudo, pacientes não fumantes apresentaram em torno de 10,6 vezes mais chance de ter HPV em relação aos pacientes fumantes (**Tabela 10**).

Tabela 10. Análise de regressão logística do novo modelo com a variável resposta HPV após ajustamento por seleção de variáveis por metodologia Backward Stepwise (Razão de Verossimilhança).

Variável	B	S.E.	Wald	Df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
FUMO	2,360	1,113	4,498	1	,034	10,594	1,196	93,834
UP	-1,293	,847	2,329	1	,127	,275	,052	1,444
OS	,833	,460	3,271	1	,071	2,300	,933	5,670
NP	,644	,483	1,776	1	,183	1,905	,738	4,913
TARV	1,354	,834	2,633	1	,105	3,872	,755	19,868
Constante	-9,048	3,320	7,427	1	,006	,000		

B – coeficiente de regressão; **S.E.** – erro padrão; **Wald** – teste estatístico de Wald; **Df** – n^o dos graus de liberdade; **Sig** – significância; **Exp(B)** – razão de chance; **UP** – uso preservativo; **OS** – opção sexual; **NP** – n^o parceiros; **TARV** – uso terapia antirretroviral

Na análise da regressão logística da variável HPV de baixo risco, as variáveis clínicas contagem de CD4⁺/mm³ e álcool apresentaram associação significativa, com os valores de $p \leq 0,044$ e 0,049 respectivamente. Com relação ao cálculo da razão de chance para a variável dependente HPV Baixo Risco, conclui-se que pacientes com resultado de CD4 entre 201 e 500 tiveram aproximadamente 14 vezes mais chance de apresentar HPV de baixo risco em relação aos pacientes com CD4 <200 e pacientes com CD4 >500 apresentaram 14 vezes mais chance em relação aos

pacientes com CD4 entre 201 e 500. Já pacientes que não consumiam álcool tiveram risco quase 15 vezes maior de apresentar HPV de baixo risco neste estudo (**Tabela 11**).

Tabela 11. Análise de regressão logística da variável resposta HPV Baixo Risco após ajustamento por seleção de variáveis por metodologia Backward Stepwise (Razão de Verossimilhança).

Variável	B	S.E.	Wald	Df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Gênero	-3,502	2,151	2,651	1	100	,030	,000	2,042
CD4	2,656	1,319	4,052	1	,044	14,243	1,073	189,125
Alcool	2,706	1,375	3,874	1	,049	14,973	1,011	221,652
CA	1,973	1,542	1,639	1	,201	7,196	,351	147,690
CO	-3,034	1,709	3,151	1	,076	,048	,002	1,372
Constante	-10,263	4,946	4,306	1	038	,000		

B – coeficiente de regressão; **S.E.** – erro padrão; **Wald** – teste estatístico de Wajd; **Df** – n^o dos graus de liberdade; **Sig** – significância; **Exp(B)** – razão de chance; **CA** – coito anal; **CO** – coito oral.

Para o HPV de alto risco a regressão logística mostrou que não houve significância com nenhuma das variáveis analisadas, embora a variável número de parceiros mostrasse uma tendência com $p \leq 0,055$, onde pacientes com mais de um parceiro teriam menor tendência a apresentar HPV de alto risco (**Tabela 12**).

Tabela 12. Análise de regressão logística da variável resposta HPV Alto Risco após ajustamento por seleção de variáveis por metodologia Backward Stepwise (Razão de Verossimilhança).

Variável	B	S.E.	Wald	Df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
TARV	1,800	1,004	3,213	1	,073	6,047	,845	43,273
OS	,766	,639	1,436	1	,231	2,152	,615	7,532
NP	1,433	,748	3,672	1	,055	4,192	,968	18,154
FUMO	1,539	1,171	1,728	1	,189	4,661	,470	46,233
Constante	-12,282	4,181	8,628	1	,003	,000		

B – coeficiente de regressão; **S.E.** – erro padrão; **Wald** – teste estatístico de Wajd; **Df** – n^o dos graus de liberdade; **Sig** – significância; **Exp(B)** – razão de chance; **OS** – opção sexual; **NP** – n^o parceiros.

A análise da associação entre duas variáveis (**Tabela 9**) mostrou que para o HPV houve associação para as variáveis fumo, mulheres heterossexuais e número de parceiros. Não fumantes tiveram maior chance apresentar HPV ($p \leq 0,016$; RC 0,11; IC 95% 0,014-0,91); mulheres heterossexuais tiveram maior chance de ter HPV ($p \leq 0,041$); pacientes com menos de um parceiro por ano tiveram mais chance de ter HPV e HPV de alto risco (HPV p 0,001, RC 0,005 e IC 95% 0,01-0,39; HPV alto risco $p \leq 0,03$). Quanto ao uso de preservativos houve uma tendência a apresentar associação ($p \leq 0,058$), onde pacientes que usaram preservativo teriam menor chance de apresentar HPV. As demais variáveis não foram significativas, todas apresentando valor de $p \geq 0,05$ para HPV.

Ao analisarmos em uma tabela de contingência com as variáveis clínicas opção sexual, gênero e HPV observamos que a incidência de HPV foi maior em pacientes heterossexuais (7%) porém esta diferença só foi significativa em mulheres heterossexuais que tiveram um predomínio com 4% e um $p \leq 0,041$. Dentre as mulheres homossexuais nenhuma foi HPV positiva e não houve mulheres bissexuais na presente amostra (**Tabelas 9 e 13**).

Tabela 13. Tabela de contingência mostrando uma correlação entre a opção sexual, o sexo e a infecção pelo HPV

SEXO			OPÇÃO SEXUAL						TOTAL	
			Hossexual		Heterossexual		Bissexual		N	%
			N	%	N	%	N	%	N	%
MASCULINO	HPV	Positivo	3	3	3	3	4	4	10	10
		Negativo	18	18	24	24	16	16	58	58
		Total	21	21	27	27	20	20	68	68
FEMININO	HPV	Positivo	0	0	4	4	0	0	4	4
		Negativo	19	19	9	9	0	0	28	28
		Total	19	19	13	13	0	0	32	32
Total	HPV	Positivo	3	3	7	7	4	4	14	14
		Negativo	37	37	33	33	16	16	86	86
		Total	40	40	40	44	20	20	100	100

Após ser feita a simples associação das variáveis clínicas com o HPV de baixo risco observa-se que não houve associação com nenhuma das variáveis. As

associações só ocorreram quando foi feita a regressão logística, onde o álcool e a contagem de CD4⁺ apresentaram associação, como exposto acima.

Ao analisarmos os resultados finais do exame citológico e correlacionarmos os mesmos com o HPV e os HPVS de alto e baixo risco observamos que as 14 amostras HPV positivas foram distribuídas da seguinte forma: 12 inflamatórios leve, 1 inflamatório moderado, 1 ASC-US e nenhum inflamatório acentuado. O paciente com ASC-US foi positivo para HPV de alto e baixo grau (**Amostra 16 –Tabela 8**). A maioria dos pacientes com HPV de alto ou baixo risco apresentou inflamação leve e nenhum inflamação acentuada (**Tabela 14**).

Tabela 14. Tabela de contingência correlacionando os resultados do exame citológico com o HPV e HPV de alto e baixo risco

		Citologia final				Total
		Inflamatório leve	Inflamatório moderado	Inflamatório acentuado	ASC-US	
HPV	Negativo	59	17	7	1	84
	Positivo	12	1	0	1	14
Total		71	18	7	2	98
HPV ALTO RISCO	Negativo	65	16	7	1	89
	Positivo	6	1	0	1	8
Total		71	17	7	2	97
HPV BAIXO RISCO	Negativo	35	4	0	1	40
	Positivo	6	1	0	1	8
Total		41	5	0	2	48

A relação entre os diagnósticos citológicos dos observadores 1 e 2 analisada pelo teste de McNemar mostrou que só ocorreram 4 discordâncias dentre as 100 amostras analisadas. O teste apresentou o p-valor de 1,000 o que mostra que não houve diferenças na avaliação dos dois observadores,

6.4 RESULTADOS DO PCR

6.4.1 Análise Quantitativa do DNA

A quantificação do DNA referente ao gene da β -globina amplificado por PCR e visualizado em gel de agarose a 2% foi realizada em cinquenta amostras, utilizando o kit comercial Puregene[®] Buccal Cell Core Kit A. Os resultados observados em um fotodocumentador mostraram amplificação para o gene da β -globina, sendo visualizados pela presença de bandas com 268 pares de bases como mostram as figuras abaixo (**Figuras 14**).

6.4.2. Análise da detecção do Papiloma Vírus Humano

O resultado da análise pela amplificação da sequência gênica da região conservada L1 do vírus, utilizando a técnica do PCR com o conjunto de primers GP5+/6+ não mostraram amplificação do gene referente ao HPV em nenhuma amostra.

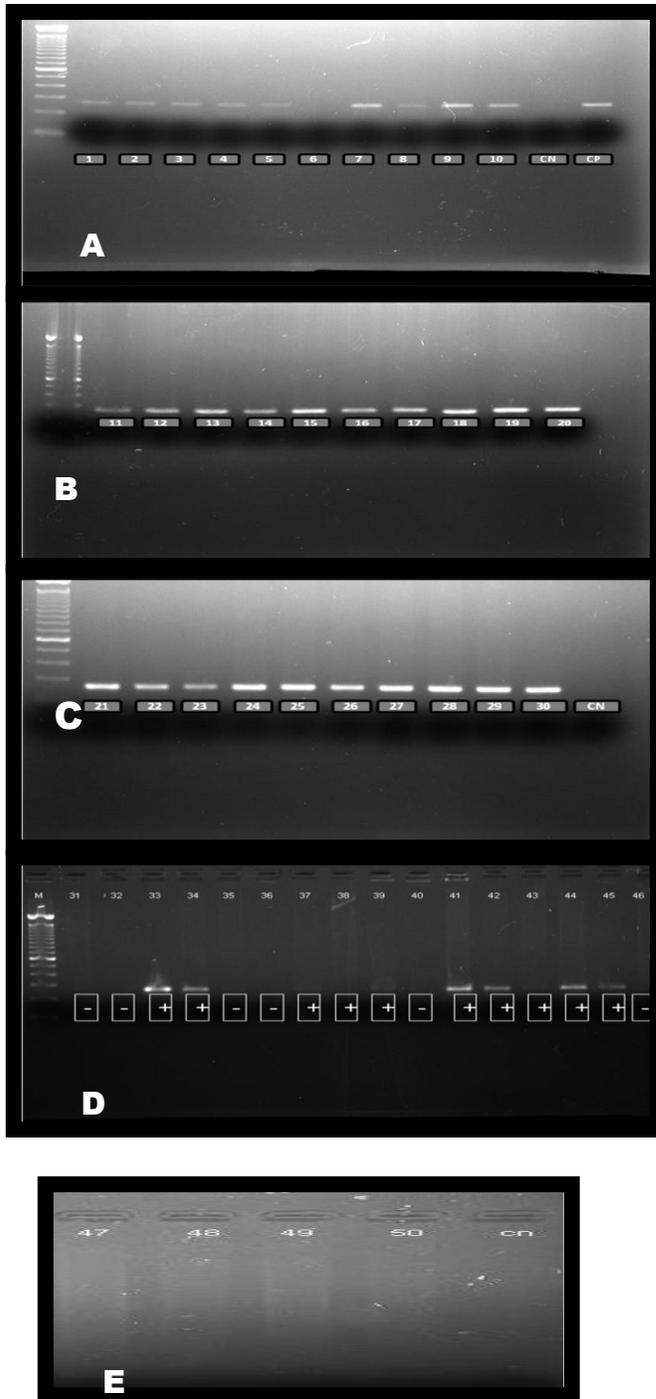


Figura 14 - Padrão eletroforético do DNA amplificado do gene da β -globina obtido após PCR. A - amostras 1 a 10, CN e CP. B - amostras 11 a 20. C - amostras 21 a 30 e CN. D - amostras 31 a 46. E - amostras 47 a 50 e CN. CP - controle positivo CN - controle negativo.

7. DISCUSSÃO

A infecção genital pelo Papilomavírus humano (HPV) de alto risco é o principal agente etiológico do carcinoma de células escamosas de colo uterino, sendo uma patologia bem estudada nos dias atuais e com critérios diagnósticos bem definidos. Atualmente é do nosso conhecimento que o HPV também pode causar infecção em outros locais do organismo, tais como trato digestivo superior e inferior (Abramowitz et al, 2007; Castro e Bussoloti, 2006; Herrero et al, 2003), porém os melhores métodos diagnósticos para detectar a presença do mesmo nestes locais ainda não estão bem estabelecidos. A literatura mostra que a infecção pelo HPV em orofaringe ainda precisa ser melhor estudada e que o HPV genital e oral é mais prevalente em indivíduos HIV- positivos, quando comparados com os HIV-negativos (Amornthatree et al, 2012; Kreuter e Wieland, 2009; Ragin et al, 2011; Torre et al, 2015), sendo maior a possibilidade de que este HPV seja de alto risco. Este é o motivo pelo qual o presente trabalho foi realizado em pacientes HIV-positivos, onde a pesquisa de HPV de alto risco pela captura híbrida e pelo PCR foi feita em 98 pacientes da amostra, e o HPV de baixo risco foi pesquisado em somente 48 pacientes.

Os estudos analisando a prevalência do HPV na mucosa de orofaringe em pacientes com ou sem lesões e HIV-positivos ou negativos mostram que os resultados variam de 4,7 a 61,3% (Steinau et al, 2012; Terry, 2001; Westra, 2014). Videla et al (2013), em estudo coorte prospectivo detectou que em homens HIV-positivos a infecção pelo HPV é menos prevalente no sítio oral do que em região anal e no pênis. Chatuverdi et al (2009), em estudo realizado com 499 230 pacientes em 15 diferentes regiões nos Estados Unidos, analisando tumores de cérvix, ânus, orofaringe, pênis e vagina detectou que o risco de HPV associado ao câncer é maior em pacientes HIV-positivo e que quanto maior a imunossupressão maior será o risco. A incidência de câncer em orofaringe é alta em pacientes HIV-positivos, principalmente em homens que fazem sexo com homens, e frequentemente estes tumores são relacionados com o HPV (Chatuverdi et al, 2011; Pugliese et al, 2014; Thavaraj et al, 2011). Esta grande variabilidade talvez possa ser atribuída a vários fatores, tais como: forma como a amostra foi coletada, métodos utilizados para testar

o DNA do HPV, tipos de HPV testados e características dos indivíduos participantes do estudo. A grande maioria dos estudos visando detectar o DNA do HPV em orofaringe utilizam técnicas moleculares, principalmente o PCR, e não usam a escova endocervical, como foi feito no presente estudo. O exame citológico para estudar as alterações morfológicas que ocorrem nas células raramente é incluído. Em nossas análises, quando consideramos a técnica da captura híbrida, o DNA do HPV foi detectado em 16,3% (16/98) das amostras, sendo os resultados análogos aos da literatura (Matthews-Greer et al, 2004).

Embora no colo uterino os esfregaços citológicos colhidos com escovas do tipo endocervical representem a melhor forma de coleta na rotina, na cavidade oral e orofaringe, como a superfície mucosa a ser examinada é maior, a maioria dos estudos citológicos têm sido realizados em material colhido por meio de lavados, da saliva, raramente utilizando a escova para fazer a coleta (Chatuverdi et al, 2011; Steinau et al, 2012). Considerando o trabalho de Doná et al (2014), que em uma análise citológica de 164 amostras de mucosa oral e de orofaringe, concluiu que o material colhido com escova tem mais células e é mais representativo, o presente estudo optou por fazer a colheita com escova, numa tentativa de obter material de melhor qualidade, uma vez que a fricção da escova na superfície mucosa pode permitir a retirada de maior número de células. Além do mais, com a escova será possível obter maior precisão na colheita (células da mucosa oral de pilares anterior e posterior, amígdalas palatinas, palato mole e base da língua), uma vez que caso sejam detectadas alterações no exame citológico *a posteriori*, sabe-se exatamente onde foi feita a retirada do material. Todas os esfregaços das amostras examinadas com a citologia convencional no presente trabalho mostraram elevada celularidade.

Dentre os poucos estudos que fazem análise citológica, a maioria (Acha A et al, 2005; Afrogheh, 2014; Castro e Bussoloti, 2006; Fuller et al, 2014) utiliza outra nomenclatura que não o sistema de Bethesda, definindo as lesões como displasia leve moderada ou avançada ou como neoplasia intra-epitelial de baixo, moderado ou alto grau. No presente trabalho optamos pelos critérios de Bethesda por serem bem definidos para as lesões de colo uterino, cujo revestimento mucoso é semelhante ao da orofaringe e por permitirem uma comunicação mais próxima entre o clínico e o

patologista. O presente trabalho realizou um estudo semelhante ao de Fakhry et al (2011), que ao estudar a associação entre o HPV16 e os achados citológicos na orofaringe em uma população de risco (pacientes HIV-positivos e com anormalidades não especificadas na mucosa de orofaringe), utilizou o sistema de Bethesda para classificar as lesões analisadas. Embora existam alguns trabalhos (Chaudhary et al, 2010; Hooper et al, 2015; Hwang et al, 2012) comparando os diferentes métodos para a detecção do DNA do HPV em orofaringe, este parece ser o primeiro que estabelece uma análise comparativa entre 4 diferentes métodos (citologia convencional e em meio líquido, captura híbrida e PCR).

Para analisar as possíveis associações entre as características demográficas, os achados clínicos e citológicos com a presença de HPV em orofaringe dos pacientes HIV-positivos foi feita inicialmente uma regressão logística e posteriormente se analisou cada variável independentemente.

Na população estudada, quando foi levada em consideração a frequência da infecção pelo HPV em relação ao gênero (Beachler et al, 2011; Gillisson et al, 2008; Steineau et al, 2012; Thavaraj et al, 2011) e a faixa etária (Parisi et al, 2011; Read et al, 2012; Steineau et al, 2012; Videla et al, 2013), os resultados obtidos foram semelhantes aos da literatura. No presente trabalho o HPV foi mais frequente em pacientes do gênero masculino (14,7%), com uma predominância pela terceira década de vida (23,1%), não tendo sido observada nenhuma diferença significativa entre o grupo etário e o gênero entre os pacientes com ou sem infecção.

Ao associarmos o HPV com o câncer de orofaringe, encontramos inúmeros trabalhos na literatura, porém, embora seja de nosso conhecimento que o HPV pode causar lesões na mucosa orofaríngea, a análise destas causadas pelo HPV em pacientes HIV-positivos é escassa (Syrjanen, 2011; Torre et al, 2015). No presente trabalho, embora 24% dos pacientes tivessem lesões orais e de orofaringe, não foi observada associação entre estas e o HPV. As lesões eram representadas por hipertrofia e hiperemia de amígdalas palatinas, afta, hiperemia de orofaringe, herpes labial e leucoplasia. Dentre os pacientes com lesões orais 20,8% (5/24) apresentaram infecção oral pelo HPV. No paciente com ASC-US e HPV-positivo a

amígdala palatina encontrava-se hiperemiada enquanto que naquele com ASC-US e HPV-negativo além da hiperemia se observava hipertrofia da tonsila.

Não há consenso na literatura quanto a relação entre a imunossupressão e o desenvolvimento de câncer em orofaringe, havendo estudos que mostram um aumento (Gillison et al, 2009) ou uma redução (Kreuter et Wieland, 2009) deste tipo de câncer em pacientes imunodeprimidos, porém inúmeros estudos mostram que há uma associação entre a baixa contagem de CD4⁺ e a alta carga viral com a prevalência do HPV na cavidade oral (Chaturverdi et al, 2009; Gaester et al, 2014; Kreuter et Wieland 2009). Dentre os 14 pacientes HPV-positivos a incidência de HPV foi maior naqueles com contagem de células CD4⁺ maior do que 500 cels/mm³. Quando analisamos o HPV de baixo risco vemos que é 14 vezes maior a razão de chance de um paciente com CD4⁺ maior do que 500cels/mm³ apresentar HPV do que aqueles com CD4 entre 200 e 500 cels/mm³. Concluindo, quando se analisa a regressão logística no presente trabalho, pacientes com contagem de células CD4⁺ abaixo de 200cels/mm³ tiveram menor chance de apresentar infecção pelo HPV de baixo risco ($p \leq 0,044$). Quando se analisa a associação entre as diferentes variáveis feita isoladamente observa-se que não há associação entre a contagem de CD4⁺ com o HPV e os HPVs de alto e baixo risco.

Há vários estudos mostrando associação entre a infecção pelo HPV cervical, as lesões intraepiteliais escamosas cervicais e o uso da terapia antirretroviral (Blitz et al, 2013; Fusté et al, 2008; Moodley et al, 2009), porém a associação entre a TARV e a infecção em orofaringe pelo HPV é pouco estudada (Amornthatree et al, 2012; Syrjanen, 2011). Alguns estudos indicam que com o advento da TARV houve um aumento da prevalência do HPV oral (Syrjanen, 2011). Múltiplos estudos mostram que a restauração imune que ocorre com a TARV permite a permanência do HPV na mucosa facilitando o desenvolvimento de infecções e algumas neoplasias (Amornthatree et al, 2012; Beachler et al, 2011; Gaester et al, 2014; Syrjanen, 2011). No presente estudo não houve associação entre a TARV e infecção de orofaringe pelo HPV.

Quando avaliamos a variável fumo vemos que a grande maioria dos trabalhos mostra uma associação entre o fumo e o HPV, o que pode ser explicado pelos efeitos deletérios das nitrosaminas, produto resultante da metabolização do tabaco, que provoca danos no epitélio de revestimento da mucosa facilitando a ação de microorganismos (Gasparin et al, 2009). No presente trabalho foi evidenciada uma associação negativa entre o HPV e o fumo, onde os não fumantes apresentaram 10,6 vezes mais chance de ter HPV do que os fumantes.

Raros são os trabalhos científicos que associam o uso da maconha com a infecção de orofaringe pelo HPV. Mark et al (2014), num estudo de caso-controle em que analisou 2395 casos (2002 CECs de orofaringe e 393 de língua) e 7798 controles detectou uma interação entre a maconha, o HPV16 e um maior risco de desenvolvimento de CEC. No presente trabalho 17% dos pacientes fumavam cigarros de maconha, porém a análise da associação entre as duas variáveis não revelou associação entre o uso de cigarros de maconha e a infecção oral pelo HPV.

Quanto ao uso de drogas ilícitas observam-se alguns trabalhos na literatura relacionando o uso das mesmas com o HIV (De Jarlais et al, 2013), porém não foi encontrado nenhum trabalho que correlacione o HPV com o uso de drogas em pacientes HIV positivos. No presente trabalho dentre os 90 não usuários de drogas, 14 eram HPV positivos, não tendo sido observada nenhuma associação entre o uso de drogas e o HPV.

Embora o uso do álcool esteja diretamente relacionado a um determinado tipo de câncer de orofaringe, sabe-se que as neoplasias relacionadas ao HPV não necessitam do álcool para se desenvolverem. No presente trabalho, quando analisamos a regressão logística considerando o uso do álcool observamos que pacientes que não consomem álcool tem 15 vezes mais chance de ter HPV de baixo risco. Entretanto, quando a associação é feita considerando somente as duas variáveis não há significância. Pugliese et al (2014) e Torre et al (2015), como o presente, não encontram associação entre o consumo de álcool e a infecção pelo HPV na mucosa de orofaringe.

O uso de preservativo durante a relação sexual é considerado por alguns autores (Gaester et al, 2014) como o mais importante fator de risco para evitar a contaminação pelo HPV e outras DSTs. Na regressão logística para a variável uso de preservativo, no presente trabalho observou-se que não houve associação entre o uso de preservativo e a presença da infecção pelo HPV. Quando os testes estatísticos avaliaram a associação entre duas variáveis isoladamente, foi observado que não houve associação, embora fosse observada uma tendência ($p \leq 0,058$) entre o uso de preservativo e a presença do HPV como um todo ou de HPV de alto e baixo risco separadamente.

Associando as observações acima ao fato de que foi pesquisada infecção em orofaringe, a variável coito oral leva ao questionamento quanto ao uso de preservativo durante o mesmo. Embora esta observação não seja regularmente incluída no questionário de avaliação, como aconteceu no presente trabalho, ela é necessária para que não ocorram erros de interpretação, uma vez que a proteção só poderá ocorrer se o preservativo for utilizado. A análise dos resultados dos testes estatísticos aqui realizados mostra que, tanto na regressão logística como na correlação entre duas variáveis isoladamente, embora o HPV de alto risco tivesse sido observado em 6,12% (6/98) e o de baixo risco em 12,5 (6/48) dos pacientes que praticaram coito oral, não houve associação entre o coito oral e a presença dos HPV de alto e baixo risco isoladamente.

Outro fator que necessita ser levado em consideração quando é avaliada a contaminação da mucosa oral pelo HPV é que os beijos dos tipos *savolium* e orogenital, que envolvem contatos profundos entre as mucosas orais e ano genitais respectivamente, são considerados por alguns autores como um dos meios de transmissão do HPV oral tanto em indivíduos normais (D'Souza et al, 2009) como em pacientes HIV-positivos (Beachler et al, 2011; Hu et al, 2013; Parisi et al, 2011; Read et al, 2012; Steineau et al, 2012). Assim sendo, o tipo de beijo realizado no relacionamento do casal passa a ser uma variável que deve ser analisada quando se considera a contaminação da cavidade oral e de orofaringe pelo HPV, o que não foi feito no presente trabalho.

Alguns autores, estudando pacientes portadores de neoplasia cervical (Park et al, 2009), pacientes sadios (Beacher et al, 2011; Parisi et al, 2011) ou portadores de HIV (Beacher et al, 2011) encontraram associação entre a presença do HPV oral e o sexo anal. No presente trabalho, embora 6,18% (6/97) dos pacientes com HPV de alto risco e 12,20% (6/48) daqueles com HPV de baixo risco que praticavam coito anal apresentassem HPV oral, não houve associação na análise estatística feita em conjunto pela regressão logística nem associando as duas variáveis isoladamente.

Poucos estudos analisam o tipo de HPV em indivíduos que fazem sexo oral e anal, estabelecendo uma análise comparativa entre eles. Parisi et al (2011), em estudo coorte analisando swabs orais e anais para detectar HPV pela técnica do PCR não observou concordância entre os tipos de HPV oral e anal. No presente estudo, embora o HPV fosse detectado na mucosa de orofaringe, não foi realizada a tipagem para analisar se havia coincidência entre os HPVs observados no orofaringe e aqueles do ânus.

Poucos estudos analisam a prevalência do HPV em homens e mulheres levando em consideração a opção sexual. Por razões que não são bem claras, estudos têm relatado que a infecção oral pelo HPV é mais frequente em homens heterossexuais (Videla et al, 2013) e em mulheres bissexuais ou heterossexuais (Ragin, 2011). No presente trabalho, a incidência mais alta de infecção pelo HPV oral foi entre pacientes heterossexuais (7% - 7/100), havendo predominância pelas mulheres heterossexuais (4% - 4/100), o que vai de encontro com o trabalho de Ragin et al (2011). A incidência mais alta de HPV em mulheres heterossexuais talvez seja justificável pelo coito oral receptivo, onde durante a penetração profunda do pênis na cavidade oral, chegando ao orofaringe, produz diminutas lesões na mucosa que facilitam a penetração do HPV até a camada basal do revestimento epitelial.

Embora a grande maioria dos autores (Beachler et al, 2011; Read et al, 2012) considerem que quanto maior o número de parceiros maior a possibilidade de pacientes HIV positivos desenvolverem HPV em orofaringe, no presente trabalho esta associação só foi detectada quando o cálculo foi considerado para <1, 1 e >1 parceiro. Quando o cálculo foi considerado para >4 e <4 ou para >10 ou <10

parceiros esta associação não foi observada. Esta ausência de associação talvez possa ser justificada por um viés ao aplicar o questionário, uma vez que a maioria dos pacientes reduz o número de parceiro depois que se contamina com o HIV, e no momento em que a questão foi aplicada, 84% dos pacientes já apresentavam infecção há mais de dois anos.

Não foi encontrado nenhum estudo associando a infecção pelo HPV em orofaringe com doenças sexualmente transmissíveis e há somente poucos trabalhos onde as variáveis infecção pelo HPV em orofaringe, infecção pelo HIV e DST têm sido avaliadas conjuntamente (Löwhagen et al, 1999; Wongood et al, 2013). Quando se analisa a associação entre as infecções oral, orofaríngea e genital pelo HPV observa-se um maior número de publicações, com alguns autores achando que há associação entre as infecções oral e genital (Castro, 2009; Crawford et al, 2011; Videla et al, 2013) e outros achando que não há (D'Souza, 2009; Marques et al, 2014; Parisi et al, 2011). No presente estudo, as DSTs detectadas pelo questionário foram sífilis, verruga genital, gonorreia e herpes, porém não houve associação entre a infecção de orofaringe pelo HPV a estas doenças.

Os critérios citológicos para definir HPV na cavidade oral não são bem estabelecidos. Embora nos esfregaços citológicos do colo uterino a presença do coilócito seja um critério importante, em orofaringe, o coilócito clássico raramente é detectado (Vianna, 2008). Alguns autores como Castro, Bussoloti, 2006 utilizam critérios que classificam como: maiores, onde o coilócito clássico com halo perinuclear e alterações nucleares são necessários e os menores que levam em consideração a disceratose, as atipias e a binucleação. Outros (D'ona, 2014) levam em consideração as atipias citológicas, utilizando sempre dois dos seguintes critérios: alargamento nuclear com aumento da relação núcleo/citoplasma, hiperchromatismo nuclear, cromatina grosseira com nucléolo proeminente, bi ou multinucleação, aumento da ceratinização, escasso citoplasma e irregularidade dos bordos nucleares.

Ao ser analisada a relação entre os diagnósticos citológicos dos observadores 1 e 2, pelo teste de McNemar, observou-se que ocorreram 4 discordâncias quanto ao

diagnóstico de ASC-US no estudo duplo cego. Após revisão o diagnóstico de ASC-US foi mantido em 2 duas amostras (16 e 41) o que representa 2% (2/100) do total, e as outras duas ficaram como inflamatório moderado. Os critérios citológicos utilizados para diagnosticar estes dois casos foram: alteração da relação núcleo/citoplasma, pleomorfismo nuclear, hiper Cromatismo nuclear e paraceratose atípica. Dentre as duas amostras diagnosticadas como ASC-US a captura híbrida revelou a presença de HPV em uma, porém não podemos atribuir ao HPV as atipias aí observadas, uma vez que havia também hifas e esporos de *Cândida sp.*, o que também pode justificar as atipias.

As alterações inflamatórias observadas em 88% (88/100) das amostras na citologia convencional foram em sua maioria (73%) alterações leves, talvez relacionadas às bactérias da cavidade bucal.

Embora a maioria dos estudos mostrem que a citologia em meio líquido é um bom método para amostras cervicais, para as amostras orais os resultados não têm sido semelhantes (Afroghrh et al, 2014; Fuller, 2015; Hayama et al, 2005; Mehrotra, 2012). No presente trabalho foram observadas alterações inflamatórias sem atipias citológicas em todas as amostras examinadas em meio líquido. Como as colheitas foram feitas na mesma localização, e na sequência da colheita a amostra para a citologia em meio líquido foi a terceira a ser feita, talvez o número de células retirados tenha sido menor e as células representativas de atipia possam ter sido colhidas na primeira amostra, a qual foi direcionada para o exame citológico convencional.

A grande maioria dos estudos analisados utiliza a técnica de PCR para o exame molecular das amostras orais (Herrero et al, 2003; Hong et al, 2012; Quintero et al, 2013; Thavaraj et al, 2011). A captura híbrida, embora seja uma técnica simples e rotineiramente usada na prática clínica para detectar o HPV nas amostras de colo uterino, não é frequentemente utilizada para a cavidade oral e orofaringe (Hooper et al, 2015; Terry et al, 2001). Poucos são os trabalhos que fazem a genotipagem do DNA do HPV em amostras orais, sendo os tipos de HPVs mais frequentemente

encontrados os 55, 83 e 84 por Steineau et al, 2012 e os tipos 16, 18 e 31 por Pugliese et al (2014).

Quando analisamos os trabalhos que comparam a eficiência da captura híbrida e do PCR para as amostras citológicas de colo uterino, vemos que a captura híbrida apresenta sensibilidade e especificidade ligeiramente maior (Boldrini et al, 2014; Chung et al, 2014; Luu et al, 2013), embora outros autores considerem que na pesquisa de HPV em carcinoma de orofaringe a captura híbrida seja tão sensível quanto o PCR (Hoper et al, 2015). Luu et al (2013) em meta análise onde foram selecionados 29 trabalhos realizados na Europa, Ásia e América do Norte, pesquisando HPV em lesões cervicais diagnosticadas como ASC-US e lesão intraepitelial de alto e baixo grau e considerando a citologia convencional e a biópsia como padrão ouro, observaram que a captura híbrida apresentou maior sensibilidade e especificidade do que o PCR.

Quanto a eficiência do PCR e da captura híbrida para detectar HPV na cavidade oral, encontramos somente os trabalhos de Hoper (2015) acima citado e o de Chaudhry et al (2010), que fazendo a análise molecular pela captura híbrida e PCR da mucosa oral de 208 pacientes com fibrose submucosa e 222 com carcinoma de células escamosas concluiu que a captura híbrida tem maior sensibilidade.

No presente trabalho, a captura híbrida detectou HPV em 14%(14/98) das amostras, sendo 8 para HPV de alto risco e igualmente 8 para HPV de baixo risco, representando respectivamente 8,2% (8/98) para o HPV de alto risco e 16,7% (8/48) para o de baixo risco enquanto que o PCR não detectou HPV em nenhuma das amostras. Conforme acabamos de ver a literatura mostra que na cavidade oral, assim como na cérvix uterina, a captura híbrida apresenta índices de positividade ligeiramente melhores, principalmente no que se refere a sensibilidade.

Ao analisar a literatura, observa-se que não há nenhum estudo que correlacione a presença de lesão/dislásia intraepitelial com a carga viral. Nas amostras de cérvix, a alta carga viral (>100RLU/PC) foi associada com maior chance de progressão da neoplasia do que a baixa carga viral (1<10RLU/CU), embora a baixa carga viral não necessariamente exclua a doença progressiva (Bae

et al, 2009; Dalstein et al, 2003; Kim et al, 2012). Na carga viral da presente amostra a relação RLU/CO variou de 1,07 a 7,87; sendo de 1,09 a 7,87 para o HPV de alto risco e de 1,07 a 2,68 para o de baixo risco, o que são valores baixos quando comparados com as cargas virais de pacientes com lesão de colo uterino, onde podem ser encontrados valores acima de 1000RLU/CO (Origoni et al, 2012). Uma vez que estudos mostram que a carga viral aumenta com a severidade da lesão (Lowe et al, 2011; Origoni et al, 2012), talvez a carga viral baixa, associada ao tamanho da amostra justifique a ausência de alterações displásicas no presente estudo. Paciente com ASC-US que teve a captura híbrida positiva, apresentou HPV de alto e baixo risco e teve a carga viral de 2,68 e 1,30 RLU/CO respectivamente.

A justificativa para a presença de 14 amostras HPV positivas detectadas pela captura híbrida e não pelo PCR talvez se deva a menor sensibilidade do PCR, apresentando maior dificuldade em detectar os casos verdadeiramente positivos, como advogam alguns autores (Hwang, 2012). Outro fato que deve ser levado em consideração é que o primer GP5⁺/6⁺ utilizado no presente trabalho não é tão sensível quanto o primer PGMY09/11 (Winder, 2009). Devemos também considerar que a captura híbrida possa ter expressado alguns resultados falso positivos, uma vez que a carga viral foi baixa na maioria das amostras. Outro questionamento que pode ser levantado é quanto a temperatura de armazenamento das amostras, uma vez que o material colhido para o PCR foi armazenado a 4°C e o da captura foi a -20°C, conforme orientação dos fabricantes. E finalmente, não poderemos deixar de levar em consideração limitação causada pela sequência de coleta das amostras, onde o PCR foi a última amostra a ser colhida.

Quando se analisa os resultados da citologia em meio líquido, em que não foram observadas células atípicas e do PCR, onde todas as amostras foram negativas, deve-se talvez considerar que a coleta deveria ter sido realizada de forma alternada.

A ausência de expressão da proteína p16INK4a em todas as amostras citológicas no presente trabalho é perfeitamente justificável, uma vez que não foi detectada neoplasia em nenhuma das amostras. Sabemos que a proteína p16INK4a

só se expressa no núcleo e no citoplasma das células neoplásicas, uma vez que ela decorre da degradação do gene RB, a qual só ocorre quando há ligação da proteína E7 com o mesmo, após a integração do DNA do HPV com o genoma de células hospedeira, quando a proteína E7 assumiu o descontrolo do ciclo celular (Westra, 2014).

A ausência de transformações displásicas observadas no presente estudo talvez possa ser atribuída ao tamanho pequeno da amostra e a baixa carga viral. Novos estudos em uma população maior, com um questionário melhor elaborado, associados a avaliação citológica e genotipagem do HPV, assim como o acompanhamento dos pacientes HPV positivos diagnosticados na presente amostra poderão adicionar conhecimentos para uma avaliação mais precisa das possíveis lesões causadas pelo HPV em orofaringe de pacientes HIV-positivos.

8. CONCLUSÕES

1. Dentre os métodos moleculares utilizados, captura híbrida e PCR, somente a captura mostrou-se eficiente para detectar o HPV em orofaringe.
2. O HPV foi detectado pela captura híbrida em 14,3% das amostras. O HPV de baixo risco foi duas vezes mais frequente do que o de alto risco.
3. A presença de ASC-US ao exame citológico, observada em 2 amostras, mostra que a citologia convencional pode ser um exame eficiente para detectar atipias em estado inicial em orofaringe, da mesma forma como é utilizado para o colo uterino.
4. Apesar de ter sido detectado HPV em uma das amostras com atipias citológicas (ASC-US), não foram observadas alterações morfológicas típicas que permitissem associar estas atipias ao HPV.
5. Embora tenha sido detectado HPV em orofaringe de alguns pacientes HIV-positivos, a estimativa da carga viral foi baixa e não foram observadas alterações citológicas sugestivas de displasia nas amostras examinadas. O acompanhamento dos pacientes com ASC-US e infecção pelo HPV é necessário para avaliar uma possível evolução para displasia.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOWITZ, L et al. Anal squamous intraepithelial lesions and condyloma in HIV-infected heterosexual men, homosexual men and women: prevalence and associated factors. **AIDS**, v.21, n.11, p.1457-65, jul.2007.

ACHA, A et al. Aplicaciones de la citología oral por raspado (exfoliativa) en el cáncer y pré-cancer oral. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.10, p.95-102, apr.2005.

AFROGHEH A et al. Application of Liquid-Based Transepithelial Flexible Brush Cytology in the Detection of High-Grade Laryngeal Mucosal Lesions. **Diagnostic Cytopathology**, v. 43, n. 1, p-80, jun.2015.

AMORNTHATREE K, et al. Impacts of HIV infection and long-term use of antiretroviral therapy and the prevalence of oral human papillomavirus type 16. **J Oral Pathol Med**, v.41, p.309–314, jun. 2012.

BALFOUR JHB, et al. Infectious mononucleosis. **Clinical & Translational Immunology**, v.4, n.e33, p-33, jan. 2015.

BAE J, et al. Natural history of persistent high-risk human papillomavirus infections in Korean women. **Gynecol Oncol**, v.115, n.1, p.75-80, oct. 2009.

BEACHLER DC, et al. Risk Factors for Oral HPV Infection among a High Prevalence Population of HIV-Positive and At-Risk HIV-Negative Adults. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 21, n.1, p.122–33, 2011.

BERNSTEIN, WB et al. Acquired immunodeficiency syndrome-related malignancies in the era of highly active antiretroviral therapy. **Int J Hematol**. v.84, n.1, p.3-11, jul.2006. Review.

BECHTOLD V, BEARD P, RAJ K. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. **J Virol**, v.77, n.3, p.2021-8, fev.2003.

BIBBO, DE CECCO J, KOVATICH A. P16INK4A as an adjunct test in liquid-based cytology. **Anal Quant Cytol Histol**, v.25, n.1, p.8-11, feb.2003.

BLITZ S, et al. Evaluation of HIV and Highly Active Antiretroviral Therapy on the Natural History of Human Papillomavirus Infection and Cervical Cytopathologic Findings in HIV-Positive and High-Risk HIV-Negative Women. **J Infect Dis**, v.208, n.3, p.454-62, aug.2013.

BOLDRINI NT et al. High-grade cervical lesions among women attending a reference clinic in Brazil: associated factors and comparison among screening methods. **PLoS One**, v.9, n.7, e102169, jul.2014.

BONNET, F et al. Malignancy-related causes of death in human immunodeficiency virus-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. **Cancer**, v.101, n.2, p.317-24, jul.2004.

BRASILEIRO FILHO G. Bogliolo patologia geral. **3ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A., 2004 p.19.**

CANTARUTTI ALL et al. Evaluation of Immunohistochemical Expression of p16 and Presence of Human Papillomavirus in Oral and Oropharyngeal Carcinoma. **J Craniofac Surg**, v.25, n.1, p. 210-214, jan.2014.

CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v.110, S4–S7, sep.2008.

CASTRO, TM; BUSSOLOTI, IF. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.72, n.2, p.272-82, apr.2006.

CASTRO TM et al. HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, by means of the PCR. **Braz J Otorhinolaryngol**, v.75, n.2, p.167-71, mar-apr 2009.

CERQUEIRA, Daniela Marreco. **Prevalência, Frequência 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.** 2007. 172 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2007. Disponível em: <http://bdtd.bce.unb.br/tesesimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=2750>. Acesso em: 20 julho. 2015.

CHAUDHARY AD et al. Comparative study between the Hybrid Capture II test and PCR based assay for the detection of human papillomavirus DNA in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. **Virology Journal**, n. 7, p.253, 2010.

CHATURVEDI, AK; MADELEINE, MM; BIGGAR, RJ; ENGELS EA. Risk of human papillomavirus-associated cancers among persons with AIDS. **J Natl Cancer Inst**, v.101, n.16, p.1120-30, aug.2009.

CHATUVERDI AK, et al. Human Pappilomavirus and Rinsing Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. **J Clin Oncol**, v.29, n.32, p.4294-301, nov.2011.

CRAWFORD DH, et al. A cohort study among university students: identification of risk factors for Epstein–Barr virus seroconversion and infectious mononucleosis. **Clin Infect Dis**, n.43, p.276–82, 2006.

CRAWFORD R et al. High prevalence of HPV in non-cervical sites of women with abnormal cervical cytology. **BMC Cancer**, v.11, 473. doi: 10.1186/1471-2407-11-473, aug.2011.

CHIAO EI, et al. Screening HIV-infected individuals for anal cancer precursors lesions: a systemic review. **Clin Infect Dis**, v.43, n.2, p.223-33, jul.2006.

CHUNG HS, HAHM C, LEE M. Comparison of the clinical performances of the AdvanSure HPV Screening Real-Time PCR, the Abbott Real-Time High-Risk HPV Test, and the Hybrid Capture High-Risk HPV DNA Test for Cervical Cancer Screening. **J Virol Methods**, v.205C, n. 6, p.57-60, may. 2014

DALSTEIN V, et al. Persistence and load of high-risk hpv are predictors for Development of high-grade cervical lesions: A longitudinal french cohort study. **Int. J. Cancer**, v.106, n.3, p. 396–403, sep. 2003.

DAY MP, SCHELHAAS M. Concepts of papillomavirus entry into host cells. **Curr Opin Virol**, n.0, p.24–31, feb.2014.

DEITZ CA et CHESSA RN. Genital, Oral, and Anal Human Papillomavirus Infection in Men Who Have Sex With Men. **J Am Osteopath Assoc**, v.111, n.3, suppl.2, S19-S25, 2011.

DE VILLIER ME. Classification of papillomaviruses. **Virology**, n.324, p.17 – 27, 2004.

DE JARLAIS DC, et al. HIV Infection Among People Who Inject Drugs: The Challenge of Racial/Ethnic Disparities. **Am Psychol**, v.68, n.4, p.274–285, 2013.

DOLENS, ES et al. Cytopathology: A Useful Technique for Diagnosing Oral Lesions?: A Systematic Literature Review. **Diagnostic Cytopathology**, v. 41, n.6, p.34, jun.2012.

DONÀ MG et al. Cytology and human papillomavirus testing on cytobrushing samples from patients with head and necksquamous cell carcinoma. **Cancer**, v.120, n.22, p.3477-84, nov.2014.

DONOVAN B. Sexually transmissible infections other than HIV. **Lancet**, v.363, p.545–56, 2004.

DEL MISTRO, A; BIANCHI, LC. HPV-related neoplasias in HIV-infected individuals. **European J. Cancer**, v.37, n.10, p.1227-35, jul.2001.

DELAVARIAN Z et al. Evaluation of the diagnostic value of a Modified Liquid-Based Cytology using OralCDx® Brush in early detection of oral potentially malignant lesions and oral cancer. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.15, n.5, p.e671-6, sep.2010.

DIETZ, CA; CHESSA, RN. Genital, Oral, and Anal Human Papillomavirus Infection in Men Who Have Sex With Men. **JAOA**, v.111, S2, march 2011, S19.

DOUGLAS, RL, SCHILLER JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. **J. Clin. Invest.**, v.116, n.5, p.1167–1173, may.2006.

D'SOUZA, G et al. Oral Sexual Behaviors Associated with Prevalent Oral Human Papillomavirus Infection. **J Infect Dis**, v.199, p.1263-9, may.2009.

EGAWA, N. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. **Viruses**, v.7, p.3863-90, jul.2015.

FAKHRY C, *et al.* Associations between oral HPV16 infection and cytopathology: evaluation of an oropharyngeal “Pap-test equivalent” in highrisk populations. **Cancer Prev Res (Phila)**, v.4, p.1378–1384, 2011.

FELLER, L et al. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. **Infect Agent Cancer**. v.25, p.4:16, nov.2009.

FULLER C et al. Adjunctive diagnostic techniques for oral lesions of unknown malignant potential: Systematic review with meta-analysis. **Head Neck**. v.37, n.5, p.80, may.2014.

FUSTÉ P, SANTAMARÍA X e CARRERAS R. New therapeutic strategies for human papillomavirus related anogenital lesions in HIV patients: highly active antiretroviral therapy and HPV vaccines. **Med Clin (Barc)**, v.131, n,1, p.30-4, jun, 2008.

GASPARIN AC et al. Prevalência e fatores associados às manifestações bucais em pacientes HIV positivos atendidos em cidade sul-brasileira. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v.25, n.6, p.1307-1315, jun. 2009.

GAESTERK et al. Human papillomavirus infection in oral fluids of HIV-positive men: prevalence and risk factors. **Sci Rep**, v.17, n.4, p.6592, Oct. 2014.

GILLISON ML, et al. Distinct Risk Factor Profiles for Human Papillomavirus Type 16 – Positive and Human Papillomavirus Type 16 – Negative Head and Neck Cancers. **J Natl Cancer Inst**, v.100, p.407 – 420, mar. 2008.

GILLISON, ML. Oropharyngeal cancer: a potential consequence of concomitant HPV and HIV infection. **Current Opinion in Oncology**, v.21, n.5, p.439-444, sept.2009.

GIULIANO AR, et al. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. **Vaccine**, v.26(Suppl 10), p.K17-K28, aug.2008.

GUILY, JL et al. Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France — The EDiTH VI study. **Journal of Clinical Virology**, v.51: p.100–104, jun.2011.

HALAVATY KK. Human papillomavirus E5 oncoproteins bind the A4 endoplasmic reticulum protein to regulate proliferative ability upon differentiation. **Virology**, n.0, p.223–230, mar.2014.

HARARI A, CHEN Z, BURK RD. HPV Genomics: Past, Present and Future. **Curr Probl Dermatol**, v. 45, p.1–18, mar. 2014.

HAYAMA FH, et al. Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.10, n.2, p.115-22, mar-apr. 2005.

HERRERO, R. Chapter 7: Human Papillomavirus and Cancer of the Upper Aerodigestive Tract. **J. Nat. Câncer Int Monographs**, v.31; p.47-51, 2003.

HERRERO R. et al. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. **Journal Natl Cancer Int**, v.95. n.23, p.1772-1783, dec.2003.

HUSMAN AMR et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improved human papillomavirus detection by PCR. **Journal of General Virology**, v.76, p.1056-1072, 1995.

HONG A et al. HPV Status of Oropharyngeal Cancer by Combination HPV DNA/p16 Testing: Biological Relevance of Discordant Results. **Ann Surg Oncol** dec 4.2012 [Epub ahead of print].

HOOPER JE et al. Hybrid Capture 2 is as effective as PCR testing for high-risk human papillomavirus in head and neck cancers. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**. v.23, n.4, p.266-72, apr.2015.

HU Y, et al. Anal human papillomavirus infection among HIV-infected and uninfected men who have sex with men in Beijing, China. **J Acquir Immune Defic Syndr**, n.64, v.1, p.103-14, sept.2013.

HWANG Y et al. Comparison of the AdvanSure Human Papillomavirus Screening Real-Time PCR, the Abbott RealTime High Risk Human Papillomavirus Test, and the Hybrid Capture Human Papillomavirus DNA Test for the Detection of Human Papillomavirus. **Ann Lab Med**, v.32; n. p.201-205, 2012.

JACOBS MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, et al. A general primer GP5⁺/GP6⁺-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. **J Clin Microbiol**, v.35, n.3, p.791-795. mar.1997.

KHARIWALA SS et al. The “HPV Discussion”: Effective Use of Data to Deliver Recommendations to Patients Impacted by HPV. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, 28. pii:0194599815597200. [Epub ahead of print], jul.2015.

KEDRA B et al. Cytological picture of the oral mucosa in patients with gastric and colon cancer. **Folia histochemica et cytobiologica** v.50, n.3, p.375–380, oct.2012.

KIM JW, et al. Factors affecting the clearance of high-risk human papillomavirus infection and the progression of cervical intraepithelial neoplasia. **J Int Med Res**, v.40, n.2, p.486-96, 2012.

KREUTER, A; WIELAND, U. Human Papillomavirus-associated diseases in HIV-infected men who have sex with men. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.22, p.109-114, apr. 2009.

KUMAR V et al. Robins&Cotrin Bases patológicas das doenças. **8ª ed. Elsevier editora, 2010.1029,1030p.**

LA COUR. Human Papillomavirus in Infants: Transmission, Prevalence, and Persistence. **J Pediatr Adolesc Gynecol**, v.25, n.2, p.93–97, apr.2012.

LASSEN P et al. HPV-associated p16 expression and response to hypoxic modification of radiotherapy in head and neck cancer. **Radiother Oncol**, v.94, n.1, p.30-5, jan.2010.

LÖWHAGEN GB, et al. PCR detection of Epstein-Barr virus, herpes simplex virus and human papillomavirus from the anal mucosa in HIV-seropositive and HIV-seronegative homosexual men. **Int J STD AIDS**, v.10, p.615-8, 1999.

LOWE B et al. Distribution of Human papillomavirus load in clinical specimens. **J Virol Methods**, n.173, v.1, p.150-2, apr.2011.

LUU HN. Comparison of the accuracy of Hybrid Capture II and polymerase chain reaction in detecting clinically important cervical dysplasia: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Med**, v.2, n.3, p.367-90, jun. 2013.

MAMMAS IN, SOURVINOS G, SPANDIDOS DA. The paediatric story of human papillomavirus (Review). **Oncology Letters**, n.8, p.502-506, 2014.

MARQUES AE, et al. Low rate of oropharyngeal human papillomavirus infection of women with cervical lesions and their partners: new data from Brazilian population. **J Oral Pathol Med**, v.44, n.6, p.453-8, jul.2014.

MARK MA et al. Association of marijuana smoking with oropharyngeal and oral tongue cancers: Pooled analysis from the INHANCE Consortium. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, n.23, v.1, p.160-71, jan.2014.

MATTHEWS-GREER J et al. Human papillomavirus detection: verification with cervical cytology. **Clin Lab Sci**. v.17, n.1, p.73, winter.2006.

MEHROTRA R. The role of cytology in oral lesions: a review of recent improvements. **Diagn Cytopathol**, v.40, p.73-83, jan.2012.

MILLER, CS; JOHNSTONE, BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis,1982-1997. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod**, v.91; n.6; p.622-35; jun.2001.

MI LEE S et al. Risk of vertical transmission of human papillomavirus throughout pregnancy: a prospective study. **Plos One**, v.8, n.6, p.1-6, jun.2013.

MOODLEY JR et al. Human papillomavirus prevalence, viral load and pre-cancerous lesions of the cervix in women initiating highlyactive antiretroviral therapy in South Africa: a cross-sectional study. **BMC Cancer**, v.9, n.7, p.275, aug. 2009.

MOORE II KA, MEHTA V. The Growing Epidemic of HPV-Positive Oropharyngeal Carcinoma: A Clinical Review for Primary Care Providers. **JABFM**, c.28, n.4, jul-aug 2015.

MUÑOZ N, et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **N Engl J Med**, v.348, n.6, p.518-27, feb.2003.

NEVILLE et al. Patologia Oral e Maxilofacial. **3ª Ed. Rio de Janeiro. Elsevier Editora, 2009. 427p.**

ORIGONI M et al. Human papillomavirus viral load expressed as relative light units (RLU) correlates with the presence and grade of preneoplastic lesions of the uterine cervix in atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) cytology. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.31, n.9, p. 2401-6, sep. 2012.

PARISI SG et al. Anal and oral human papillomavirus (HPV) infection in HIV-infected subjects in northern Italy: a longitudinal cohort study among men who have sex with men. **BMC Infectious Diseases**, n.11, p.150, may. 2011.

PARKIN DM, BRAY F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. **Vaccine**, 31, v.24; Suppl 3:S3, p.11-25, aug. 2006.

PARK IU et al. Rate of vertical transmission of human papillomavirus from mothers to infants: Relationship between infection rate and mode of delivery. **Virology Journal** n.9, p. 80, 2012.

PARK, IU, et al. Anal human papillomavirus infection and abnormal anal cytology in women with genital neoplasia. **Gynecol Oncol.** v.114, n.3, p.399-403, sep. 2009.

PUGLIESE DB, et al. Oral prevalence and clearance of oncogenic human papilloma virus in a rehabilitation community for substance abusers in Italy: a case of behavioral correction? **J Oral Pathol Med**, doi:10.1111/jop.12291.[Epub ahead of print], 2014.

QUINTERO K et al. Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. **Braz J Otorhinolaryngol**, v.79, n.3, p.75-81, may/jun. 2013.

RAGIN C et al. Oral HPV Infection and Sexuality: A Cross-Sectional Study in Women. **Int J Mol Sci**, v.12, n.6, p.3928-3940, jun. 2011.

READ TR et al. Oral human papillomavirus in men having sex with men: risk-factors and sampling. **PLoS One**, n.7, v.11, e49324, nov.2012.

RAIOL T et al. Genetic variability and phylogeny of the high-risk HPV-31, -33, -35 and -58 in Central Brazil. **J Med Virology**, v.81, n.4, p.685-92, apr.2009.

RAUTAVA J, SYRJANE S. Biology of Human Papillomavirus Infections in Head and Neck Carcinogenesis. **Head and Neck Pathol**, v.6, p.S3–S15, 2012.

ROSENBLATT, C; WROCLAWSKI, ER; LUCON, AM; PEREYRA, EAG. HPV na Prática Clínica. **1ª ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Editora Atheneu, 2006. 286p.**

RUFFIN IV MT et al. Human papillomavirus in amniotic fluid. **BMC Pregnancy and Childbirth**, n.6, p.28, sep. 2006.

SAINI R et al. High-risk human papillomavirus in the oral cavity of women with cervical cancer, and their children. **Virology Journal**, n.7, p.131, 2010.

SOLOMON D, RITU N. Sistema Bethesda para Citologia Cervicovaginal.**2ª ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 2004. P. 3,67, 89.**

SOUTO R, FALHARI PB, CRUZ AD. O Papilomavírus Humano, um fator relacionado com a formação de neoplasia. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.2, n.51, p.155-160, 2005.

STEINAU M, et al. Oral sampling and human papillomavirus genotyping in HIV-infected patients. **J Oral Pathol Med**, v.41, n.4, p.288-91. nov.2012.

STRICKLER HD, et al. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. **J Natl Cancer Inst**, v. 97, n.8, p.577-86, apr 2005.

SYRJÄNEN S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **J Clin Virology**, v.32; suppl; S59-66, mar.2005.

SYRJÄNEN S. Human Papillomavirus Infection and Its Association with HIV. **Adv Dent Res** v.23, n.1, p.:84-89, 2011

TANDON R et al. Abnormal anal cytology in HIV-infected women. **Am J Obstet Gynecol**, v.201, n.21, p.e1-6, mar.2010.

TERRY G, et al. Detection of high-risk HPV types by the hybrid capture 2 test. **J Med Virol**, v.65, n.1, p.155-62, sep.2001.

THAVARAJ S et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. **J Clin Pathol**, v.64, p.308-312, apr.2011.

TORRE DD et al. Comparison of the prevalence of human papilloma virus infection in histopathologically confirmed premalignant oral lesions and healthy oral mucosa by brush smear detection. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v.119, n.3, p.333-9, mar.2015.

TOUYZ LZG. The kiss of death: hpv rejected by religion. **Current Oncology**, v.20, n.1, p. e33, fev.2012.

TROTTIER, H; FRANCO, EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine**, v.24, p. S1-15, mar.2006.

TSIODRAS S et al. Hybrid capture vs. PCR screening of cervical human papilloma virus infections. Cytological and histological associations in 1270 women. **BMC Cancer**, v.22, n.10, p.53, fev.2010.

VIANNA, LMS. Aplicabilidade do Sistema de Bethesda no Diagnóstico das Lesões Escamosas Orais e Importância do Papilomavírus na Gênese dessas Lesões. **2008, 124p, Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília.**

VIDELA S, et al. Natural history of human papillomavirus infections involving anal, penile, and oral sites among HIV-positive men. **Sex Transm Dis**, v.40, n.1, p.3-10, 2013.

WANG et al. P16 as a surrogate biomarker for human papillomavirus-associated oropharyngeal carcinoma: Considerations of some aspects. **Cancer Sci**, v.104, n.12, p.1553-59, dec.2013.

WESTRA WH. Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: Evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas. **Oral Oncology**, v.50, n.9, p.771–779, sep.2014.

WINDER DM, et al. Sensitive HPV detection in oropharyngeal cancers. **BMC Cancer**, v.15, n.9, p.440, dec.2009.

WINGOOD GM, et al. Efficacy of an HIV Intervention in Reducing High-Risk HPV, Nonviral STIs, and Concurrency among African-American Women: A Randomized Controlled Trial. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v.63 .S36–S43, jun.2013.

XAVIER SD, et al. Frequência de aparecimento de HPV na mucosa oral de homens com HPV anogenital confirmado por biologia molecular. **Arq. Int. Otorrinolaringol**, v.11, n.1, p.36-44, apr.2007.

ZACKS S, et al. Social stigmatization and hepatitisC virus infection. **J Clin Gastroenterol**, n. 40, p.220–4, 2004.

10. APÊNDICES

10.1. APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Leonora Maciel de Souza Vianna, Médica Patologista, Professora da Faculdade de Medicina (Departamento de Patologia) da Universidade de Brasília, estou desenvolvendo a pesquisa **“Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral de portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV)”** e venho por meio desta convidá-lo a participar da mesma. Essa pesquisa tem por objetivo avaliar a presença de HPV e de possíveis lesões por ele causadas na cavidade bucal de pacientes HIV positivos. A pesquisa apresenta grande contribuição no acompanhamento de pacientes portadores do HIV, permitindo não somente detectar a presença do mesmo na cavidade bucal como também diagnosticar precocemente as lesões por ele causadas. Para a execução da mesma inicialmente o paciente deverá responder um questionário, no qual serão solicitadas informações clínicas que possam ter relação com a presença de HPV na cavidade oral de pacientes portadores do HIV. Posteriormente deverá ser executada uma oroscopia seguida de colheita do material, a qual será feita friccionando uma escova sobre a mucosa oral com a finalidade de colher células do revestimento para exame citológico e molecular. A oroscopia é o exame detalhado da cavidade oral, no qual se observa toda a mucosa da boca para detectar possíveis lesões. O exame citológico será feito por meio da fricção com uma escova, com fricção da mesma em diferentes locais da mucosa, com a finalidade de colher as células que descamem; estas células serão transportadas para lâminas de vidro, onde será feito um esfregaço para ser corado e examinado ao microscópio. Para o estudo molecular o material também será colhido com escova, da mesma forma que àquela feita para o exame citológico. O estudo molecular tem por finalidade analisar o DNA das células com a finalidade de afastar a possível presença do Papilomavírus humano e detectar possíveis alterações celulares por ele causadas.

Os exames e a colheita serão feitos por mim, médico anatomopatologista que participa do curso de doutorado da Faculdade de Medicina – UNB. Todas as dúvidas decorrentes do resultado dos exames realizados serão devidamente esclarecidas assim como será proposto o tratamento, o qual deverá ser executado pela equipe técnica dos Ambulatórios da UNB, com orientação dos professores, ou por outras clínicas do HUB, caso seja necessário.

Sua participação nessa pesquisa é voluntária, isenta de qualquer forma de remuneração ou custo e não determinará qualquer risco ou prejuízo. Caso seja detectada alguma lesão, ela será tratada ou acompanhada, conforme a indicação clínica. É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento, deixando a participação no trabalho, sem qualquer prejuízo para a sua assistência no HUB. Informo ainda que, em qualquer etapa do estudo, estarei à disposição para esclarecer qualquer eventual dúvida através dos telefones 3448-5501, 3448-5500 e 3448-4999. Também será possível entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina-UnB, por meio do telefone 3307-2276.

Comprometo-me a:

- Garantir o sigilo e a privacidade dos participantes;
- Utilizar as informações única e exclusivamente para a execução do projeto em questão;
- Divulgar as informações de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o sujeito da pesquisa.

PARTICIPANTE

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li sobre o estudo pesquisa **“Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral de portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV)”**. Ficaram claras para mim quais os propósitos do estudo, os métodos a serem realizados e a garantia de esclarecimentos de minhas dúvidas em qualquer tempo.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes e durante o mesmo, sem qualquer tipo de penalidade ou prejuízo.

Brasília, / /

Assinatura e RG do Participante

Assinatura e RG do Pesquisador

10.2. APÊNDICE B – Questionário

1. Sexo: () feminino () masculino
2. Idade: ____anos
3. Lesão oral externa () sim () não
4. Estado imunitário (dosagem de CD4): _____/mm³
 (dosagem CD8):_____ /mm³
 CD4/CD8 _____
 Carga viral cópias: _____
 Log: _____
5. Tempo de infecção pelo HIV: _____anos
6. Uso de terapia ARV: () sim () não
7. Prática coito anal: () sim () não
8. Prática coito oral:() sim () nao
9. Quando iniciou o coito anal: _____ anos
- 10.Quando iniciou o coito oral:_____ anos
- 11.11- Número de parceiros:_____
- 12.Tabagismo: () sim () não Qtos cigarros/dia?:
- 13.Etilismo: () sim () não Bebe qtos dias na semana?:
- 14.Usou maconha: () sim () não
- 15.Uso de drogas: () sim () não
- 16.Parceiro(a) atual com lesão anogenital: ()sim () não
- 17.Parceiro(a) atual com lesão anogenital oral: ()sim () não
- 18.Parceiro(s) anterior(es) com lesão anogenital ou oral por HPV: () sim () não

19. Frequência das atividades sexuais

20. Usa preservativo: () sim () não

21. História de doença sexualmente transmissível

22. Orientação sexual:

a. Heterossexual ()

b. Homossexual ()

c. Bissexual ()

