

ROBERTO JOSÉ CARVALHO DA SILVA

Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em homens soropositivos e negativos ao HIV: persistência e relação histológica de lesões clínicas e subclínicas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Dermatologia

Orientador: Prof. Dra. Luisa Lina Villa

São Paulo

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Roberto José Carvalho da

Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em homens soropositivos e negativos ao HIV : persistência e relação histológica de lesões clínicas e subclínicas / Roberto José Carvalho da Silva. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Dermatologia.

Área de concentração: Dermatologia.

Orientadora: Luisa Lina Villa.

Descritores: 1.Infecções por Papillomavírus 2.HIV 3.Homens 4.Condiloma acuminado 5.História natural do HPV

USP/FM/SBD-093/10

Dedico esta tese aos meus pais, Pedro e Maria do Socorro,
ao meu inesquecível irmão, Wellington (*in memoriam*) e ao meu sobrinho,

Guilherme.

Agradecimentos

Este trabalho foi resultado de muito esforço, dedicação e com a colaboração de muitos colegas e amigos.

Inicialmente gostaria de agradecer ao Professor Dr. Alberto Duarte, professor associado do departamento de Dermatologia pelo LIM 56, por ter me acolhido no início e acreditado em minha proposta do estudo.

Ao Professor Dr. Jorge Casseb, meu amigo e ex-orientador, pela sua disponibilidade e dedicação com que conduziu este trabalho com muito apreço e amizade.

A minha orientadora, a Professora Dra. Luisa Lina Villa, pesquisadora e chefe do grupo de Virologia do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer São Paulo, pelos ensinamentos, pela generosidade com que se dispusera a realizar os exames de biologia molecular, base fundamental desse estudo. Também pelos ensinamentos e pela mulher extraordinária, dinâmica e apaixonante por tudo o que faz. Sempre acreditando no potencial de cada um. Por quem eu tenho o privilégio e a graça de Deus de tê-la como uma verdadeira mestra. O meu eterno agradecimento!

A Dra Míriam Soto, coordenadora da pós-graduação do Departamento de Dermatologia da USP, pelo acolhimento e orientação.

Aos Dr Kleber Simões do Espírito Santo, do Departamento de Patologia da USP, e a Dra Ilana Halpern Salomon, do Departamento de Dermatologia da USP, pela revisão das lâminas de biópsias desse estudo que fundamentaram os dados.

A Dona Eli, secretária do Departamento de Dermatologia pelas orientações em relação à documentação e cuidado com os pós-graduandos.

A Professora Dra Denise Pimentel Bergamaschi do Departamento de Estatística de Saúde Pública da USP pela disponibilidade e cooperação na análise dos dados que foram importantes nos resultados desse trabalho. Dou graças a Deus pela sua competência durante suas aulas que me fizera entender de forma tão simples a bioestatística.

Pela diretoria do Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS de São Paulo-CRT-DST/AIDS, Dra Maria Clara e Dr Arthur Kalichmam pela possibilidade de realizar este trabalho e pesquisas na instituição criando oportunidades aos profissionais para crescimento intelectual.

A minha amiga Mariza e companheira de trabalho no CRT, doutoranda em saúde pública, pela atenção e cooperação na análise dos dados.

A todos da biblioteca do CRT que com agilidade providenciaram os artigos para a composição desse trabalho.

Ao laboratório do CRT que possibilitaram o armazenamento das amostras até serem processadas no Ludwig.

A minha chefia dos núcleos da Especialidade e da DST do CRT-DST/AIDS pela cooperação nesse momento importante de minha vida.

A todos os meus colegas dos ambulatórios do núcleo de DST e da Especialidade do CRT-DST/AIDS, São Paulo pela paciência e apoio nas horas mais difíceis, e pelo incentivo permanente. A todos vocês minha gratidão!

À Stella, pela simplicidade, calma e apoio facilitando a comunicação com o pessoal do Ludwig.

Aos técnicos do Laboratório de Virologia do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer São Paulo, Antonieta, Cecília, João Pereira Sobrinho e José Carlos, pela dedicação e ajuda na realização da PCR.

Aos pacientes que concordaram em participar desse estudo, sem os quais não seria possível a sua realização.

Ao meu grande amigo e companheiro Henrique A. Nozari pelo permanente apoio, incentivo e por me transmitir calma nos momentos difíceis durante o desenvolvimento desse estudo.

Por fim, agradeço a Deus pela saúde e pelo desejo de realizar mais um sonho em minha vida e por ter verdadeiros amigos e uma minha família, base de minha vida.

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviações, símbolos e sigla	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Summary	
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 - Biologia do HPV	6
2.2 - Classificação dos tipos de HPV.....	12
2.3 - Potencial Oncogênico.....	14
2.4 - Replicação Viral.....	14
2.5 - Co-fatores na infecção pelo HPV	18
2.6 - Fatores de Risco no Homem.....	19
2.7 - Transmissão do HPV.....	20
2.8 - Prevalência da Infecção pelo HPV em Homens	21
2.9 - Incidência e persistência da infecção pelo HPV em homens	23
2.10 - Formas de apresentação da infecção pelo HPV	25
2.11 - Características histológicas das lesões induzidas pela infecção do HPV	29
2.12 - Co-infecção HIV e HPV	32
3 - OBJETIVO GERAL.....	35
3.1 - Objetivos Específicos	35
4 – CASUÍSTICA E MÉTODOS	36

4.1 - Tipo de estudo.....	36
4.2 – Local do estudo	36
4.3 - População de estudo.....	36
4.4 - Aspectos Éticos.....	38
4.5 - Procedimentos.....	38
4.5.1 - Peniscopia.....	39
4.5.2 - Coleta de células em todas as visitas.....	40
4.5.3 - Biópsia.....	40
4.5.4 - Análise histopatológica das lesões clínicas e aceto-brancas penianas	41
4.5.5 - Teste de biologia molecular para HPV	43
4.4.6 - Análise estatística.....	44
5 - RESULTADOS	46
5.1- Dados Demográficos	46
5.2 - Avaliações do comparecimento e do raspado peniano nas quatro visitas	47
5.3- Avaliação histopatológico das lesões clínica e subclínica do Pênis	53
5.4- Avaliação do DNA de HPV nas lesões clínica e subclínica do Pênis	57
6 - DISCUSSÃO.....	63
7 - CONCLUSÕES.....	75
8 - ANEXOS.....	77
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

LISTA DE ABREVIações, SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
APCs	Células apresentadoras de antígenos
CDC	Centers for Disease Control
CMV	Citomegalovírus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DST	Doença sexualmente transmissível
ENV	Gene do envelope viral
GAG	Gene do core viral
GP	Glicoproteína
HAART	Highly Active AntiRetroviral Treatment
HIM	História Natural da Infecção por HPV em Homens
HC/FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1
HIL	Lesão epitelial escamosa de alto grau
HPV	Papilomavírus Humano
HTLV-1	Vírus T-linfotrópico humano do tipo 1
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IL	Citocinas inflamatória
ILPC	Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer
kD	quiloDalton

LCR	Long Control Region
LTR	Long Terminal Repeat
NEF	negative replication factor
NCR	Non-coding region
nM	Nanômetro
ORFS	Open Reading Frames
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PIN	Neoplasia intraepitelial peniana
POL	Gene da polimerase
REV	Gene regulador
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonúcleico mensageiro
SIL	Lesão epitelial escamosa de baixo grau
TAT	Gene regulador
TNF	Fator de necrose tumoral
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
URR	Região regulatória contracorrente

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo com o comparecimento das visitas..... 47
- Tabela 2.** Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo dos resultados do DNA do HPV por visita..... 48
- Tabela 3.** Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo com a persistência, a eliminação, a aquisição e ausência do DNA do HPV durante a coorte 48
- Tabela 4.** Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo com os tipos de HPV segundo a oncogenicidade..... 49
- Tabela 5.** Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo com os tipos de HPV..... 50
- Tabela 6.** Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo com as infecções simples e múltiplas pelo HPV 51
- Tabela 7.** Distribuição do número e porcentagem dos casos, no grupo HIV positivo, de acordo com a persistência, aquisição, eliminação e ausência da infecção pelo HPV com HAART, carga viral plasmática do HIV e linfócito T CD4..... 52
- Tabela 8.** Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo com a histologia das lesões clínicas acetobranças segundo os critérios do Departamento de Patologia 54
- Tabela 9.** Distribuição do número e porcentagem das lesões clínicas e acetobranças de acordo os critérios histológicos do Departamento de Patologia..... 55
- Tabela 10.** Distribuição do número e porcentagem dos casos, no grupo HIV positivo, de acordo com a histologia das lesões clínicas acetobranças segundo os critérios do Departamento de Dermatologia 56

- Tabela 11.** Distribuição do número e porcentagem das lesões clínicas e acetobranças de acordo com a histologia segundo a classificação do Departamento de Dermatologia 56
- Tabela 12.** Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, dos tipos de HPV encontrados na biópsia de 86 lesões clínicas..... 58
- Tabela 13.** Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, dos tipos de HPV encontrados na biópsia de 50 lesões acetobranças 59
- Tabela 14.** Distribuição do número e porcentagem dos tipos de HPV segundo número e oncogenicidade encontrados na biópsias de lesões clínicas, nos homens soropositivos e soronegativos ao HIV 60
- Tabela 15.** Distribuição do número e porcentagem dos tipos de HPV segundo número e oncogenicidade encontrados na biópsias de lesões acetobranças, nos homens soropositivos e soronegativos ao HIV 61
- Tabela 16.** Distribuição do número e porcentagem dos tipos de HPV segundo número e oncogenicidade encontrados na biópsia de lesão clínica e acetobrança 62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Modelo atômico do capsídeo do papilomavírus humano.	7
Figura 2a.	Estrutura representativa do genoma do HPV-16.....	8
Figura 2b.	Microscopia eletrônica das partículas virais de HPV e do genoma viral.....	9
Figura 3.	Árvore filogenética do Papillomavirus.	13
Figura 4.	O ciclo replicativo do papillomavírus humano.	16
Figura 5.	Integração do HPV no genoma celular.	18
Figura 6.	Lesões clínicas de HPV no pênis.....	26
Figura 7.	Lesões clínicas de HPV no pênis.....	27
Figura 8.	Lesões subclínicas, após colocação de ácido acético a 5%.	28
Figura 9.	Colilocitose.....	30
Figura 10.	Papilomatose e acantose	31
Figura 11.	Paraqueratose.....	31

Resumo

Silva RJC. Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em homens soropositivos e negativos ao HIV: persistência e relação histológica de lesões clínicas e subclínicas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

INTRODUÇÃO: Co-infecção HPV / HIV altera história natural das infecções por HPV, aumentando o risco de verrugas e neoplasias malignas do trato ano-genital. Há, no entanto, escassez de estudos de coorte envolvendo HPV no pênis dessa população. **MÉTODOS:** Estudo longitudinal, não probabilístico, com 144 homens de 18 e 70 anos de idade, sendo 72 HIV positivos e 72 HIV soronegativos, parceiros de mulheres com patologia associada a infecção pelo HPV. O estudo foi conduzido numa clínica pública de doenças de transmissão sexual em São Paulo (CRT-DST/AIDS), entre fevereiro de 2004 a março de 2005. Os participantes do estudo foram acompanhados por 180 dias para avaliar a persistência, a aquisição e a eliminação do DNA de HPV nos esfregaços penianos por meio da PCR. Este estudo também visou: Correlacionar os aspectos clínicos das lesões genitais com a histologia e a presença de DNA HPV; Comparar a aquisição, persistência, eliminação e ausência da infecção pelo HPV com a carga viral plasmática do HIV, contagem de células T CD4 e uso de terapia anti-retroviral (HAART). **RESULTADOS:** Não houve associação estatisticamente significativa nos dois grupos em relação a persistência, eliminação, aquisição ou mesmo ausência de HPV durante o seguimento. O grupo HIV positivo apresentou uma maior frequência dos tipos oncogênicos de HPV em relação ao grupo HIV negativo ($P = 0,041$), além de uma maior frequência de múltiplos tipos de HPV durante o seguimento de 180 dias ($P = 0,049$). As maiores taxas de aquisição e persistência de HPV foram observadas entre portadores de alta carga de HIV, baixo número de células T CD4, e não usuários de HAART. Aqueles em terapia anti-retroviral, com menos cópias de HIV e alto nível de T CD4 apresentaram maiores taxas de eliminação e ausência de HPV. **CONCLUSÕES:** Homens de ambos grupos podem ser considerados de alto risco, não tendo sido observada diferença na persistência, aquisição e a eliminação de DNA de HPV. Os homens HIV positivos apresentaram uma maior frequência de infecção múltipla de HPV bem como os tipos mais frequentes foram os oncogênicos em relação aos HIV negativos durante o seguimento. Os tipos de HPV 16, 6 e 84 foram os mais frequentes nos homens soropositivos ao HIV, enquanto naqueles HIV negativos, predominaram os tipos de HPV 6, 51 e 84. As lesões clínicas e aceto-brancas observadas nos 2 grupos apresentaram as mesmas características histológicas, sendo colicitose e papilomatose as mais significativas nas lesões clínicas quando comparada às lesões aceto-brancas. Nas lesões verrucosas, apenas um tipo de HPV foi observado, predominando o tipo 6 ou 11. Em torno de 23% das lesões aceto-brancas eram HPV negativas, sendo que nas positivas predominou o HPV 6. Homens soropositivos ao HIV que estavam usando HAART, com carga viral do HIV alta e contagem de células T CD4 baixa apresentaram maiores taxas de aquisição e persistência da infecção pelo HPV. Entretanto, os que não

estavam em terapia anti-retroviral, com carga baixa de HIV e contagem de células T CD4 alta apresentaram maiores taxas de eliminação e ausência de infecção pelo HPV.

DESCRITORES: 1. Infecções por Papillomavirus 2. HIV 3. Homens 4. Condiloma acuminado 5. História natural do HPV.

Summary

Silva RJC. Human Papillomavirus (HPV) infection in HIV positive and negative men: analysis of HPV persistence and histological findings in clinical and sub-clinical lesions. [thesis].São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

BACKGROUND: Co-infection with HPV and HIV modifies its natural history and increases the risk of warts and neoplasia development in the anogenital tract. Cohort studies to address HPV infection in the penis are scarce, mainly in HIV infected individuals. **METHODS:** A longitudinal study, non-probabilistic, was conducted with 144 men of 18 to 70 years old including 72 HIV-positive and 72 HIV-negative, partners of women with HPV-associated disease. The study was conducted between February 2004 and March 2005 at a large sexually transmitted clinic in São Paulo (CRT-DST/Aids). Men were followed for 180 days to determine persistence, acquisition and clearance of HPV DNA in penile swabs using PCR. In addition, we aimed to correlate the clinical features of genital lesions with histology and the presence of HPV DNA, compare the acquisition, persistence, clearance and absence of HPV infection with plasma HIV viral load, CD4 T-cell count and use of HAART. **RESULTS:** Both groups showed no significant differences regarding persistence, clearance, acquisition and/or absence of HPV during follow-up. Penile smears of HIV-positive men showed a higher frequency of oncogenic types in relation to the HIV-negative ($P = 0.041$), as well as a higher frequency of multiple HPV types ($P = 0.049$). Significantly higher HPV DNA acquisition and persistence rates were observed among HIV-positive men not submitted to HAART, with higher HIV loads and lower CD4+ cells count. Among those men using anti-retroviral therapy, lower viral loads and higher T cell counts, higher rates of clearance and HPV DNA absence were observed. **CONCLUSIONS:** This male population altogether is considered to be at high risk of HPV DNA infection, which may be the reason why no differences in HPV acquisition, persistence and clearance were observed. HIV-positive men had a higher frequency of multiple HPV infection and the most frequent were oncogenic types. HPV types 16, 6 and 84 were the most frequently found in HIV-positive men, while in HIV-negative men, HPV types 6, 51 and 84 prevailed. Clinical and aceto-white lesions presented the same histological features in both HIV seropositive and -negative men. Koilocytosis and papillomatosis were the most significant histological features found in clinical lesions when compared to the aceto-white lesions. In condylomas, only one type of HPV was present, often HPV 6 or 11. About 23% of aceto-white lesions had no HPV DNA; in HPV-positive lesions, the predominant type was HPV 6. Higher rates of acquisition and persistence of HPV infection occurred in men who were using HAART, with high HIV viral load and low count of CD4. In contrast, those not under anti-retroviral therapy, had low HIV load and high CD4 T cells levels showed higher rates of clearance of HPV infection.

KEY WORDS: 1. Papillomavirus infections 2. HIV 3. Men 4. Condyloma acuminatum 5. HPV, nature History

1 – INTRODUÇÃO

As infecções genitais, ocasionadas pelo papilomavírus humano (HPV), são um problema de importância crescente, devido à sua elevada frequência, associação ao câncer e implicações clínicas além do grande impacto psicológico nos indivíduos acometidos (Clarke et al., 1996; Conaglen et al., 2001; Baseman e Koutsky, 2005; Marra et al., 2009).

O HPV é considerado sexualmente transmissível, cuja prevalência varia entre 1,3% a 72,9%, de acordo com os relatos na literatura. Essa variação é decorrente do tipo de população estudada e do emprego de diferentes métodos de diagnóstico nos vários estudos (Baseman e Koutsky, 2005; Dunne et al., 2006; Giuliano et al., 2008). Apresenta a tendência de crescimento da prevalência, pelo acúmulo de casos pela infecção, devido a uma das características peculiares do HPV, que consiste na discutida impossibilidade de remoção total do vírus do epitélio infectado, mediante intervenções médicas (Ward et al., 1994; Lassus et al., 1994), e por se tratar de uma infecção do epitélio, muitas vezes, multicêntrica e com poucos sintomas ou assintomática (Gross, 1997).

Nos últimos 30 anos, vários estudos foram realizados para a compreensão da história natural da infecção pelo HPV e dos mecanismos celulares na gênese neoplásica, diagnóstico, tratamento e controle nas mulheres provavelmente devido às altas taxas de incidência e de mortalidade do câncer do colo uterino. Todos esses conhecimentos proporcionaram um

impacto positivo significativo, entretanto, não obstante os avanços conseguidos, ainda permanecem como desafio, dado que constitui uma das principais causas de morbidade na população masculina, no que diz respeito a doenças sexualmente transmissíveis. De fato, o homem tem um papel importante na disseminação do HPV e muito se tem discutido sobre sua participação nas freqüentes recidivas e persistência da infecção entre mulheres. Como outras doenças sexualmente transmissíveis, alguns autores sugerem que o HPV pode ser mais facilmente transmitido de homens para mulheres do que de mulheres para homens (Campion et al., 1985; Kyo et al., 1994). Entretanto, outro estudo recente da Hernandez e colaboradores (2008), mostrou o inverso, mais facilmente transmissível da mulher para o homem.

A grande maioria dessa infecção pelo HPV é transiente e a eliminação desse vírus ocorre rápido em indivíduos imunocompetentes (Partridge e Koutsky, 2006; Giuliano et al., 2008). Estudos revelam, ainda, que infecções por HPV têm uma probabilidade menor de persistir em homens do que em mulheres, mas é possível que isto possa mudar com os estudos em andamento, como no estudo HIM (Van Doornum et al., 1994; Wideroff et al., 1996; Svare et al., 1997). A persistência da infecção poderá causar lesões clínicas dependendo do tipo de HPV, do sistema imunológico do hospedeiro e de co-fatores. Os tipos de HPV de baixo risco oncogênico são responsáveis pelos casos de verrugas no ânus e genitais em ambos os sexos. Entretanto, a infecção pelo HPV de alto risco oncogênico tem sido atribuída aos cânceres (Muñoz et al., 2003).

Nos países desenvolvidos e em desenvolvimento em 2002, constatou-se a prevalência de HPV, em 100% dos casos de câncer do colo uterino, 40% dos casos de câncer de pênis, vulva e vagina, 90% nos casos de câncer de ânus, 3% de câncer de boca e 12% do câncer de orofaringe (Parkin, 2006; Parkin e Bray, 2006).

Muitos estudos têm relacionado o papel do parceiro masculino na epidemiologia da gênese do carcinoma do colo uterino. Entretanto, estudos de lesão peniana e infecção por HPV em homens são escassos e restritos a população de alto risco para DST ou parceiros de mulheres com doença relacionada ao HPV (Rosemberg et al., 1987; Barrasso et al., 1987; Campion et al., 1988; Hippelainen et al., 1991; Aynaud et al., 1994; Rombaldi et al., 2006). Nesses estudos são mostrados que existe variação na classificação das lesões associadas ao HPV que varia de condiloma à neoplasia epitelial peniana. Deste modo, fica clara a necessidade de padronizar a classificação destas lesões.

A maioria dos estudos epidemiológicos da infecção pelo HPV refere-se a indivíduos HIV negativos (Castellsagué et al., 1997; Lazcano-Ponce et al., 2001; Svare et al., 2002; Baldwin et al., 2003; Weaver et al., 2004; Giuliano et al., 2008). Vários estudos, entretanto, mostram que indivíduos, genéticos e iatrogenicamente imunossuprimidos, apresentam alto risco de infecção por HPV e de doenças a ele relacionadas (Chopra et al., 1997; Arany et al., 1998; Gage et al., 2000; Silverberg et al. 2002).

A co-infecção HPV-HIV tem sido objeto de vários estudos, devido aos riscos aumentados de neoplasias benignas e malignas da região anogenital (Breese et al. 1995; Sun et al., 1997; Rezza et al., 1997; Palefsky et al., 1998; Aynaud et al., 1998), às diferenças nos aspectos evolutivos e no comportamento epidemiológico (Chin-Hong e Palefsky, 2005).

É reconhecido que a infecção pelo HIV, por comprometer o sistema imunológico, faz com que aumente o risco de infecção pelo HPV. Estudos mostram um aumento no risco, de até dez vezes, em ter verrugas genitais e que a prevalência de HPV entre mulheres HIV positivas poderá ser de até três vezes maior quando comparadas as HIV negativas (Garzetti et al., 1995). Além disso, o quadro clínico da infecção pelo HPV parece ser muito mais agressivo, quando se trata de imunocomprometidos (Arany et al., 1998; Gage et al., 2000; Silverberg et al., 2002). Indivíduos com grave comprometimento nas funções imunológicas podem apresentar uma alta prevalência de infecção pelo HPV assim como se verifica aumento da incidência de lesões causadas pelo HPV em mulheres imunossuprimidas pelo HIV (Levi et al., 2002; Chin-Hong e Palefsky, 2002 e 2005).

A maioria dos estudos relacionados ao HPV em homens soropositivos para o HIV tem como objetivo o canal anal devido às altas taxas de infecção pelo HPV e de incidência da neoplasia intra-epitelial anal e câncer do canal anal (Critchlow et al. 1998; de Sanjosé e Palefsky, 2002; Palefsky e Holly, 2003; Chin-Hong e Palefsky, 2005) e poucos estudos envolvendo a região peniana (Gomousa-Michael et al. 2000; Aboulaflia e Gibbons, 2001; Sirera et al.2006).

Interessante que a frequência de carcinoma do pênis é baixa, entretanto, nos HIV positivos, a taxa de ocorrência é de duas a três vezes maiores do que em homens HIV negativos (Abouafia e Gibbons, 2001).

No Brasil, há insuficiência de estudos nessa linha de pesquisa que instigam a curiosidade científica de investigar essa ocorrência em populações vulneráveis, principalmente em homens soropositivos para HIV, em serviços que atendam a essa população específica. Em face disso, desenvolvemos este projeto de pesquisa que teve início no mestrado, no qual geramos resultados preliminares de prevalência de DNA do HPV e fatores de risco. No Brasil são raros os dados estatísticos da incidência e prevalência da infecção pelo HPV, principalmente em homens portadores da infecção pelo HIV.

Em face da escassez nas referências bibliográficas sobre a persistência, eliminação e aquisição do HPV peniano em homens soropositivos e também pela dificuldade de se obter consenso quanto à classificação histopatológicas das lesões induzidas pelo HPV decidiu-se fazer o estudo de uma população de alto risco para a aquisição e transmissão das DST.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - BIOLOGIA DO HPV

Os papilomavírus constituem um grupo de pequenos vírus de DNA, pertencentes à família *Papillomaviridae*, gênero *Alfa*, *Beta*, *Gama* e outros-*papillomavirus*, capazes de infectar animais e homens (Bernard, 2005). São vírus epiteliotrópicos, podendo induzir no homem uma grande variedade de lesões proliferativas (Bernard, 2005). Os papilomavírus são altamente espécie-específico, entretanto, apenas os papilomavírus bovino 1 e 2 infectam tecido mesenquimal e uma espécie cause infecção produtiva em outra espécie (IARC, 2007) . Atualmente, há mais de 200 tipos de HPV descritos. Entretanto, cerca de 100 tipos de HPV foram identificados, com seus genomas inteiros, isolados e completamente seqüenciados (Bernard, 2005).

O HPV possui um genoma de DNA com dupla fita, circular, não envelopado, com simetria icosaédrica e constituído por 7.200 a 8.000 pares de base (Doorbar et al., 1986 e 1987; Komly et al., 1986). O material genético está envolto por um capsídeo, que possui um diâmetro de 50nm. Este, por sua vez, possui 72 subunidades (capsômeros), formadas por duas proteínas estruturais, denominadas de L1 e L2 (Modis et al., 2002). **Figura 1.** A proteína principal que compõe o capsídeo viral, L1, é gênero-específica, serve como indicador indireto da infectividade; possui cerca de 55kD e representa em torno de 80% de toda a

proteína viral. Também, ela possui sítio de epítomos, alvo da resposta imune, para a ligação de anticorpos neutralizantes (Chen et. al., 2000). A proteína secundária do capsídeo viral, L2, é altamente tipo-específica, tendo cerca de 70kD (Brown et al., 1993).

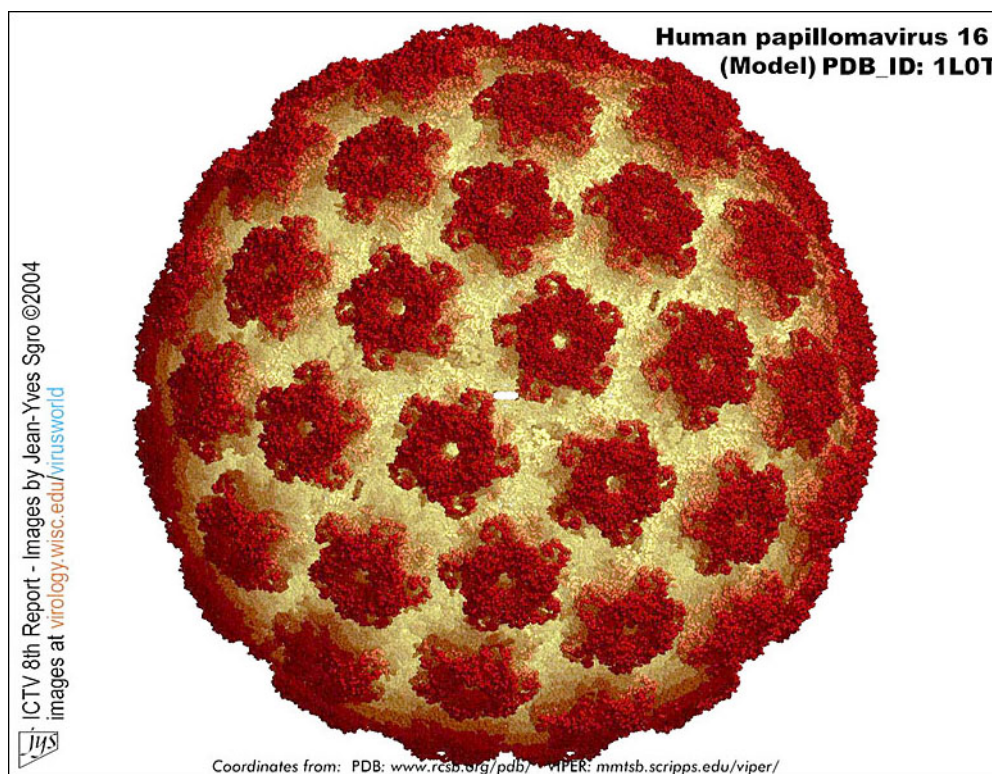


Figura 1 Modelo atômico do capsídeo do papilomavírus humano.

O genoma do vírus está dividido em três regiões, denominadas ORFs (*Open Reading Frames* ou unidades de tradução), as quais se encontram em uma mesma fita de DNA, hoje, conhecidas como genes que codificam as proteínas virais. No genoma viral, existem três fragmentos subgenômicos, que podem ser identificados: região precoce (*Early*), que representa 45% do genoma, região tardia (*Late*), que representa 40% do genoma, e a região

denominada NCR (*non-coding region*) ou LCR (*Long Control Region*), que representa 15% do genoma e contém elementos regulatórios da transcrição e da replicação viral (Sousa et al., 1990) - **Figura 2a e 2b.**

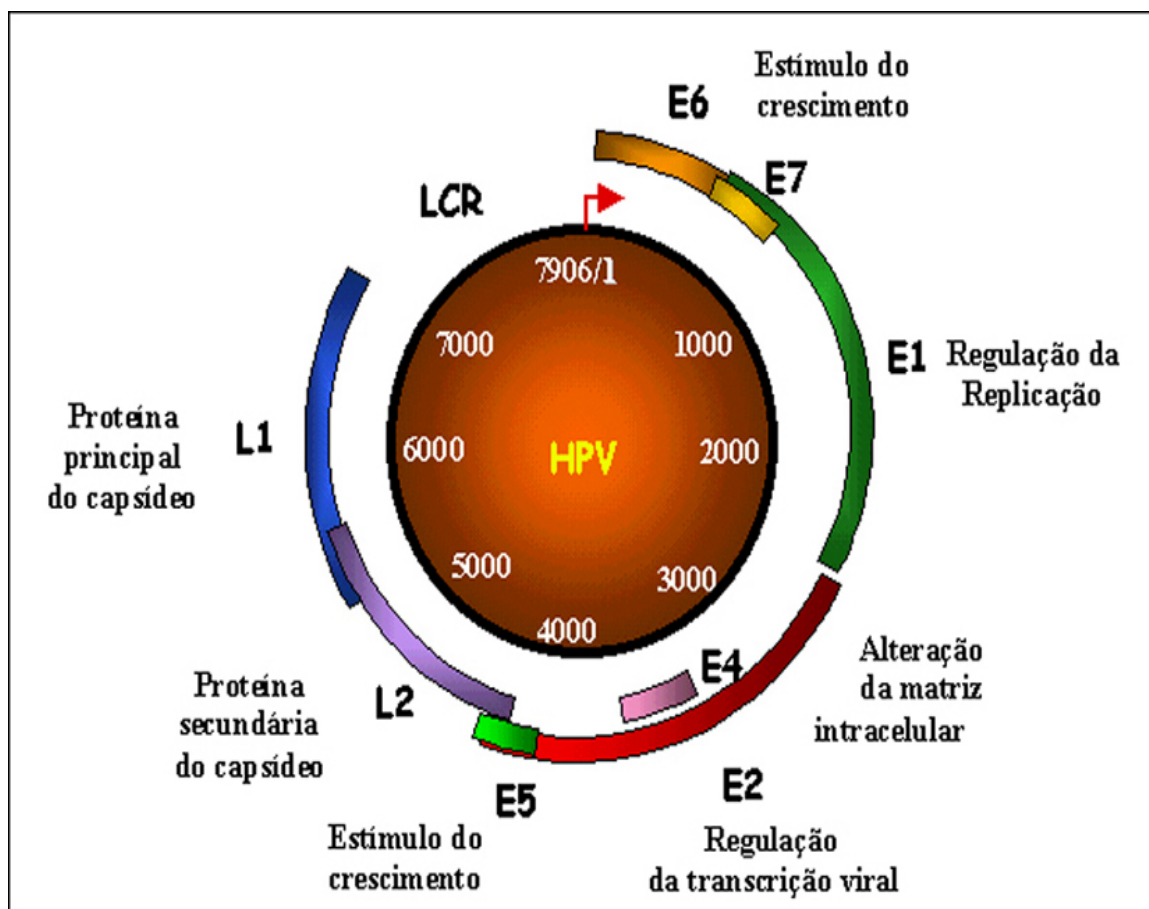


Figura 2a. Estrutura representativa do genoma do HPV-16. Região precoce (*Early*), região tardia (*Late*) e LCR (*Long Control Region*) que corresponde à região regulatória (Revisado por Villa, 1997).

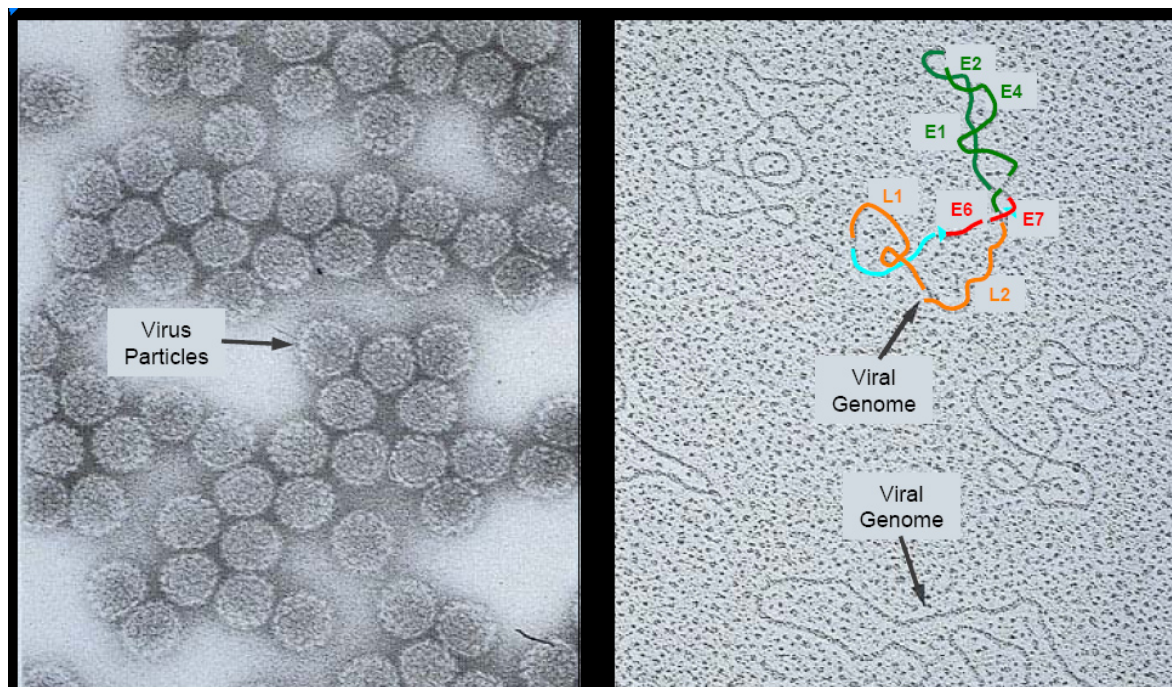


Figura 2b.Microscopia eletrônica das partículas virais de HPV e do genoma viral. (Doobar, 2009).

Há oito genes na região precoce da maioria dos papilomavírus, denominados de E1 a E8, com importantes funções na replicação (E1), na transcrição do DNA (E2, E1) e na transformação celular (E5, E6 e E7) (revisado por zur Hausen, 2000).

A proteína codificada pelo gene E2, além de controlar a transcrição dos genes virais - E6 e E7 - parece possuir atividade estimuladora da função da proteína supressora tumor p53. A proteína E2 também interage com E1 na estimulação da replicação, por facilitar a ligação de E1 à origem de replicação (Chiang et al., 1992).

A detecção da proteína E4 é feita nas camadas mais diferenciadas do epitélio infectado (Palefsky et al., 1991), durante o ciclo produtivo viral (Doorbar et

al., 1986). A função de E4 ainda não é bem conhecida e acredita-se que sua produção esteja ligada à diferenciação terminal dos queratinócitos. Para alguns autores, a proteína E4 seria responsável pela alteração da arquitetura celular, conhecida como coilocitose (Doorbar et al. 1986; Roberts et al. 1997). O rompimento da arquitetura da célula pode facilitar a liberação de partículas virais (Doorbar et al., 1991).

A proteína E5 é a principal proteína transformante dos papilomavírus bovinos (Schiller et al., 1986), enquanto que nos HPV apresenta apenas uma fraca atividade de transformação, amplificando o sinal mitogênico do receptor de crescimento epidérmico (Pim et al., 1992).

A expressão do gene E6 consiste de uma proteína nuclear de cerca de 150 aminoácidos, que se liga ao produto do gene p53 (Werness et al., 1990), levando à sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina (Scheffner et al., 1990 e 1993). A proteína p53 tem como função, a regulação do ciclo celular, e por isso, o seu gene é considerado como supressor tumoral (Kern et al., 1991; revisado por Levine, 1997). Assim, sua degradação, promovida por E6 de HPV, desregula este controle. Acreditava-se que apenas a proteína E6 de HPV, de alto risco oncogênico, fosse capaz de se ligar à p53 (Crook et al., 1991; Lechner e Laimins, 1994) e, devido ao fato de tanto pRB, como p53, serem proteínas supressoras de tumor e perderem sua função que resulta em proliferação celular descontrolada (O'Connor et al., 1997). No entanto, logo depois, Storey e colaboradores (1998) observaram que E6 de HPV-11 também é capaz de degradar p53, mas com menor intensidade do que a proteína de HPV-16. Uma

observação importante é que somente as proteínas E6/E7 de HPV, de alto risco oncogênico, podem desempenhar a atividade de imortalização nos queratinócitos humanos primários e transformação celular, mas as proteínas análogas de HPV de baixo risco oncogênico não têm estas atividades (O'Connor et al., 1997).

O produto do gene E7 é uma fosfoproteína, com cerca de 100 aminoácidos, que se liga à forma hipofosforilada da proteína celular pRB, produto do gene retinoblastoma, um gene supressor de tumor. A proteína E7 forma um complexo com as proteínas de controle do ciclo celular, como pRB, p107, p130 e ciclina A, e esta habilidade parece estar relacionada à sua capacidade de induzir a proliferação e imortalização de células (Dyson et al., 1989 e 1992; Tommasino et al., 1993). A associação E7-pRB faz com que pRB perca sua função de regular negativamente o ciclo celular (Münger et al., 1989; O'Connor et al., 1997). As proteínas E7, dos tipos de HPV de alto risco oncogênico, como 16 e 18, ligam-se a pRB com maior afinidade que aqueles classificados como de baixo risco oncogênico, por exemplo, 6 e 11 (revisado por zur Hausen, 2000).

Os genes L1 e L2, da região tardia, codificam as proteínas principais e secundárias do capsídeo, respectivamente, ambos são seqüências altamente conservadas entre todos os papilomavírus (Bernard et al., 1994a). Conforme anteriormente mencionado, a proteína L1 é a mais abundante do capsídeo viral e constitui cerca de 80% do total das proteínas virais. Ela possui, ainda, epítomos tipo-específicos e é altamente imunogênica. A proteína L2, associada à L1, participa da incorporação do DNA viral (revisado por Zhou e

Frazer, 1996). Em contraste aos genes precoces, os genes tardios são expressos nas camadas superficiais do epitélio (Howley, 1996; revisado por zur Hausen, 2000).

2.2 - CLASSIFICAÇÕES DOS TIPOS DE HPV

Recentemente, a nova taxonomia dos Papilomavírus foi reconhecida pela ICTV (international Council on the Taxonomy of Viruses) como um vírus pertencente à família *Papillomaviridae*, gênero papilomavírus Alfa, Beta, Gama e outros (de Villiers et al., 2004). Clinicamente, o mais importante gênero é o Alfa-papillomavírus, pois contém todos os tipos de HPV associados às lesões da mucosa genital. **Figura 3.**

A classificação em tipos de HPV é feita com base na homologia de suas seqüências de DNA. Atualmente, variações no genoma nos genes L1, E6 e E7, menores que 2%, são consideradas como variantes dos tipos de HPV, variações entre 2% e 10%, como subtipos, e variações maiores que 10%, como novos tipos de HPV (Bernard et al., 1994b). Os HPV foram numerados de acordo com a ordem de identificação, de forma que o HPV do tipo 1 foi o primeiro a ser descrito e o HPV18, o décimo oitavo, assim por diante.

Atualmente, há mais de 200 tipos de HPV descritos. Entretanto, destes, apenas cerca de 100 tipos de HPV foram identificados, com seus genomas isolados e completamente seqüenciados (Bernard, 2005). Aproximadamente, 40

tipos infectam o genital e o ânus, sendo que pelo menos 14, segundo o IARC 2007, estão associados ao carcinoma do colo do útero (revisado por de Villiers, 2001).

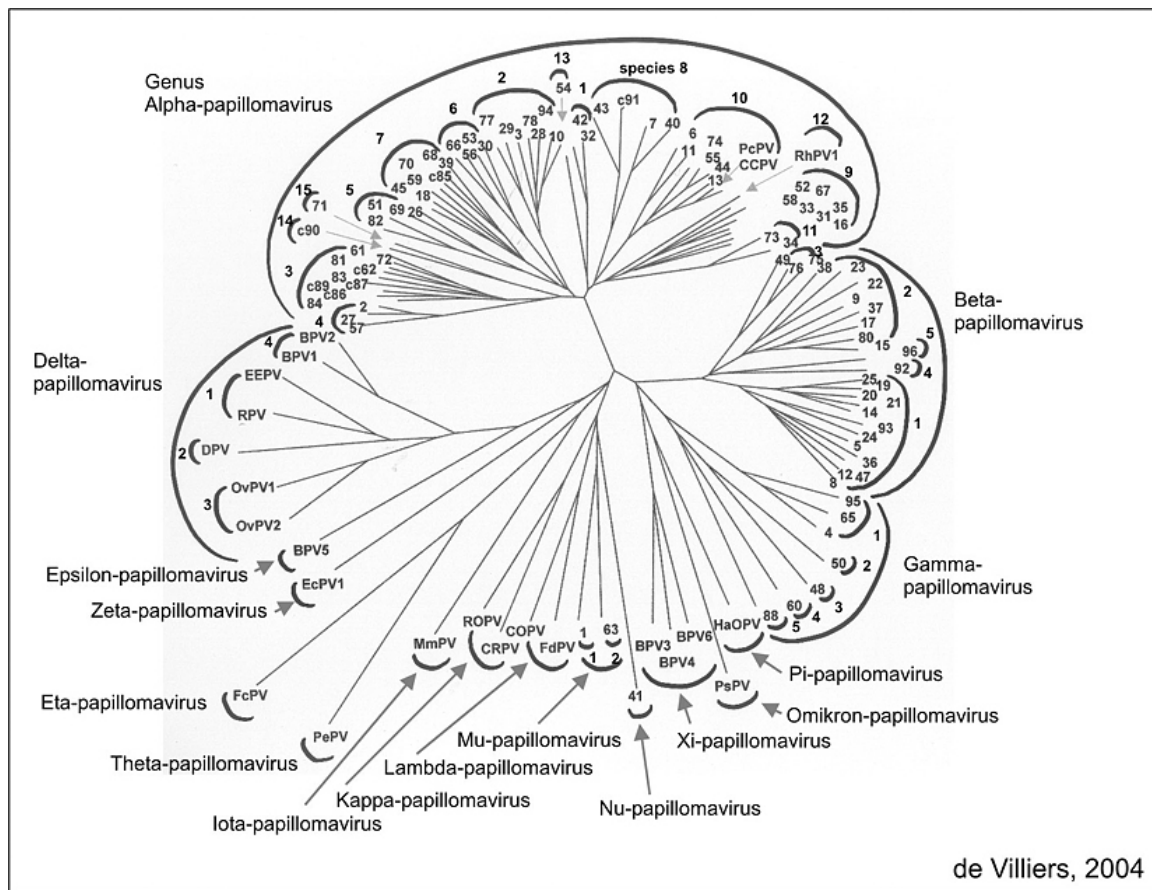


Figura 3. Árvore filogenética da família *Papillomaviridae*.

2.3 - POTENCIAL ONCOGÊNICO

A classificação dos HPV tende a ser muito variável, pois há diversos critérios de agrupamento baseados tanto em procedimento biológico *in vitro*, como em filogenia nucleotídica ou epidemiológica (IARC, 2005).

Os tipos de HPV que infectam o trato genital podem ser divididos em dois grupos. Os tipos que pertencem ao grupo de baixo risco oncogênico, que ocorrem, freqüentemente, em lesões benignas, lesões intra-epiteliais de baixo grau e, raramente, são encontrados em lesões cancerosas. Eles são os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, e CP6108. O grupo de alto risco oncogênico, que ocorre, freqüentemente, em lesões intra-epiteliais de alto grau e, especialmente, nos carcinomas, são os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 (Munoz et al., 2003). Os tipos 26, 53 e 66 são provavelmente de alto risco oncogênico, e os tipos 34, 57 e 83 são de risco indeterminado (Munoz et al., 2003).

2.4 - Replicação e transcrição Viral

Os HPV infectam as células da camada basal do epitélio, através de microlesões. Como os HPV não codificam enzimas necessárias para sua própria

replicação, eles possuem estratégias que asseguram a continuação do ciclo normal das células suprabasais, permitindo a replicação viral (Galloway, 2003). As interações precisas entre as proteínas do capsídeo e dos receptores celulares não estão claras, embora estudos sugiram que o heparan sulfato seja o mediador inicial para a entrada do vírus na célula (revisado por Doorbar, 2005). Nessa fase, a expressão gênica viral é amplamente suprimida, embora a expressão de alguns genes virais precoces (E6 e E7) seja limitada, resultando na intensificação da proliferação das células infectadas e na sua expansão lateral no epitélio.

A transcrição viral é iniciada a partir do promotor p97 (em HPV-16), determinando um único transcrito policistrônico, iniciado em E6 (revisado por zur Hausen, 1996), o qual pode, ou não, ser processado e ter, como resultado final do processo traducional, mais de uma proteína, a partir de uma mesma seqüência codificadora (Arends et al., 1990). A regulação da transcrição dos genes virais é complexa e controlada por fatores de transcrição virais e celulares. A maioria dessas regulações ocorre na região LCR, que varia um pouco em relação à composição de nucleotídeos entre os diferentes tipos de HPV, conforme apresentado anteriormente. A região LCR encontra-se entre L1 e E6, possui entre 500 e 1000 pb. Trata-se de uma região onde não existe uma ORF de tamanho detectável (Chan et al., 1989). Essa região contém a origem de replicação do DNA, vários promotores para a síntese de RNAm e seqüências reguladoras da transcrição do DNA (Broker, 1987; Brown e Fife, 1990) – **Figura 2a e 2b.**

Em um segundo momento, parte da progênie viral migra para as células em diferenciação da camada suprabasal, onde se inicia a expressão dos genes virais tardios. O genoma circular é então replicado, e são formadas as proteínas estruturais que irão compor o capsídeo viral. Nas camadas superiores do epitélio ocorre a montagem das partículas virais completas e, conseqüentemente, a liberação das mesmas para que o ciclo seja reiniciado (zur Hausen, 2002) – **Figura 4.**

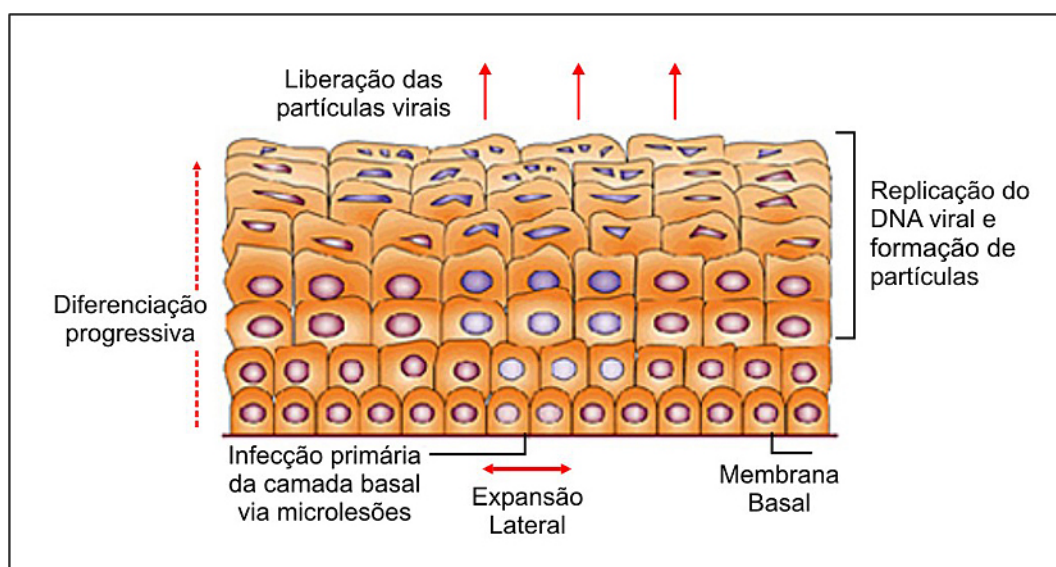


Figura 4. O ciclo replicativo do papilomavírus humano. Para que a infecção seja produtiva, o vírus precisa infectar a camada basal e isso normalmente ocorre através de microlesões na pele ou na mucosa. As células infectadas, ao se dividirem, espalham-se lateralmente. Algumas dessas células progenitoras migram para as camadas diferenciadas suprabasais, onde genes virais são ativados, o DNA viral é replicado e as proteínas do capsômero são formadas. As partículas virais surgem e são liberadas juntamente com a descamação celular na superfície da mucosa, podendo infectar células próximas (modificado de zur Hausen, 2002).

O período mínimo entre a infecção e a liberação das partículas de HPV, é, em média, de três semanas. Estudos em modelos animais e a observação clínica mostram que esse intervalo pode variar, de quatro semanas a muitos meses (Oriol, 1971). Durante essa fase, grande parte das lesões é eliminada pelo sistema imune espontaneamente, mas em alguns casos, os vírus podem escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, resultando em uma infecção persistente (Stanley, 1998).

A integração do DNA viral no DNA celular parece ocorrer ao acaso. Por outro lado, a quebra do genoma viral ocorre, geralmente, entre a extremidade 3' do gene E1 e a extremidade 5' do gene E2 (**Figura 5**). Esta ruptura leva à interrupção do processo de regulação negativa da transcrição viral, antes exercido por E2 (Howley, 1996). Ocorre então, a síntese contínua das oncoproteínas virais E6 e E7, propiciando a imortalização celular. Os tipos virais que integram com mais frequência ao genoma humano são os tipos 16 e 18 (Lowy et al., 1994). É importante ressaltar que as infecções por HPV, isoladamente, não são capazes, por si só, de induzirem progressão para lesões precursoras, sendo que menos de 2% das lesões induzidas por esse vírus evoluirá para a neoplasia invasora, o que demonstra a necessidade de interação com outros eventos moleculares (Meijer et al., 2000). Por outro lado, nas lesões benignas, induzidas pelo HPV, o DNA viral é encontrado na forma epissomal, ou seja, não integrado ao genoma da célula hospedeira e em múltiplas cópias.

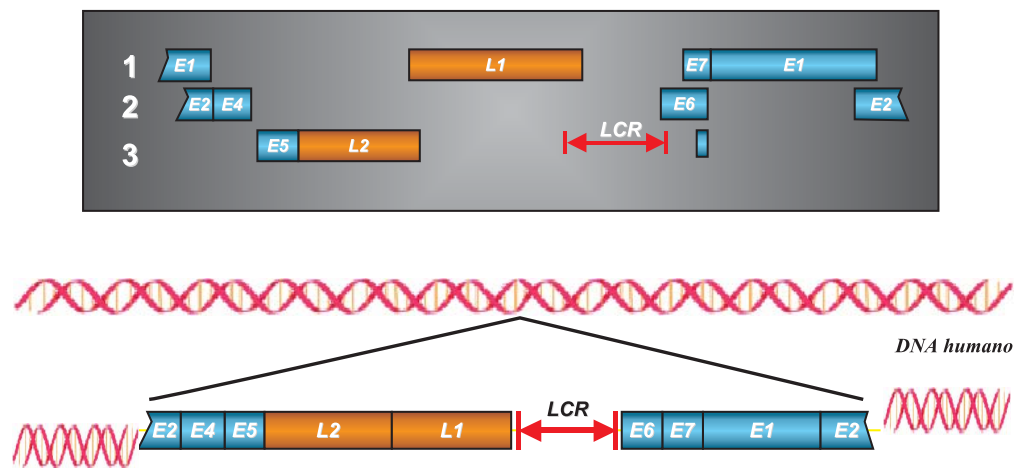


Figura 5. Integração do HPV no genoma celular. (cedido por A Trevisan, ILPC, SP).

2.5 - CO-FATORES NA INFECÇÃO PELO HPV

Como a maioria das infecções pelo HPV, mesmo aquelas causadas pelos tipos de alto risco oncogênico, são necessárias, mas não suficientes ao desenvolvimento neoplásico, há que considerar fatores ambientais ou do próprio hospedeiro, que contribuam no processo carcinogênico. Como exemplos desses co-fatores são citados os hormônios, respostas imunológicas e herança genética. Como co-fator hormonal, cita-se a progesterona, cuja ação *in vitro* sobre a LCR viral, estimula a transcrição de HPV 16. Outros carcinógenos, como os encontrados no fumo, podem também ter participação direta como agentes mutagênicos, ou provocarem imunodeficiência local (Villa, 1997). Quanto a fatores hereditários, Magnusson e colaboradores (2000) demonstraram que pelo menos 27% da variabilidade na suscetibilidade ao

desenvolvimento neoplásico no colo uterino podem ser explicadas pelo polimorfismo genético.

2.6 – FATORES DE RISCO NO HOMEM

O conhecimento sobre os fatores de risco para a infecção do HPV na genitália masculina é limitado devido aos poucos estudos relacionados à história natural da infecção do HPV nessa população. A maioria dos fatores de risco para a detecção do HPV nos homens está relacionada naqueles encontrados nas mulheres. Os fatores preditores mais importante para a aquisição de qualquer tipo de HPV são: número de parceiros sexuais na vida, idade jovem, e não circuncisão (Svare et al., 2002; Giuliano et al., 2009a). A circuncisão reduz a prevalência de HPV (Castellsagué et al., 1997; Tobian et al., 2009, Giuliano et al., 2009a), bem como a probabilidade de eliminação da infecção pelo HPV (Lu et al., 2009), provavelmente devido à redução na predisposição do epitélio não cornificado (Schiffman et al., 2003). Os homens circuncidados eliminam de 3 e 6 vezes mais a infecção para qualquer tipo de HPV e aos tipos oncogênicos, respectivamente, em comparação com os não circuncidados (Lu et al., 2009). Homens com história de verrugas anogenitais apresentam um risco de 5 a 6 vezes para o carcinoma celular escamoso (Maden et al., 1993).

2.7 - TRANSMISSÃO DO HPV

A transmissão do HPV é considerada, preferencialmente, sexual em adolescentes e adultos (Siegel e Mellinger, 1992; Rotola et al., 1994; Kjaer et al., 2001; Winer et al. 2006; Hernandez et al., 2008). Entretanto, as rotas não sexuais são possíveis dependendo do tipo de HPV e das lesões clínicas associadas a ele, podendo ser transmitido pelo contato da pele com fômites (Strauss et al., 2002), por auto-inoculação (Sonnex et al., 1999) ou perinatal.

Existem poucos estudos de transmissão sexual que determine o risco da infecção. Todos os estudos publicados até o momento são transversais e avaliam a concordância de HPV nos casais (Hippelainen et al., 1994; Nicolau et al., 2005; Bleeker et al., 2002). O mais recente estudo (Bleeker et al., 2005) encontrou que 37% dos casais heterossexuais estavam infectados pelo mesmo tipo de HPV. Porém, o estudo de Oriel (1971), determinou o risco de 50% de infecção pelo HPV após único contato sexual com parceiro infectado pelo HPV. Também Rosemberg e colaboradores (1987) no estudo de 199 parceiros de mulheres com doenças associadas ao HPV no seu trato genital inferior, concluíram que 73% dos homens tinham evidências de infecção pelo HPV na avaliação inicial e dos outros 27%, que não tinham lesão, apenas 4% deles as desenvolveu durante os seis meses seguintes.

Diversos autores já demonstraram a presença do HPV em líquido amniótico, na pele e orofaringe de recém-nascido, em proporções de até 73% (Kaye et al., 1994; Pakarian et al., 1994; Cason et al., 1995; Kaye et al., 1996; Tseng et al.,

1998). Apesar da alta proporção encontrada, não se observa um grande número de crianças com lesões, como seria esperado, na suposição de que toda contaminação resultasse em lesão.

A transmissão vertical do HPV é fortemente sugerida, considerando a ocorrência da papilomatose recorrente de laringe juvenil em crianças com menos de dois anos de idade e a partir de alguns casos relatados de recém-nascidos que apresentavam condiloma genital ao nascer. Esses dados comprovam a tese de que o HPV pode acometer indivíduos sem atividade sexual, contudo, são eventos raros (Chen et al., 1993).

2.8 - PREVALÊNCIAS DA INFECÇÃO PELO HPV EM HOMENS

A análise de dados de sete estudos caso-controle sobre o câncer do colo do útero, desenvolvida por Franceschi e colaboradores (2002), revelou uma prevalência de 13,1% entre esposos de mulheres sem doença (saudável) (controle), 21,5% entre aqueles de mulheres com carcinoma “*in situ*” e 17,5% entre os esposos de mulheres com carcinoma invasivo de colo do útero, mostrou evidência importante da presença da infecção do HPV em homens, como fator de risco para o câncer cervical.

Alguns autores encontraram uma variação na prevalência do DNA de HPV entre homens saudáveis. Em torno de 16% na Finlândia (Hippeläniemi et al., 1993), 35% em Seattle, EUA (Weaver et al., 2004), 49% e 44,6% no México (Lazcano-Ponce et al., 2001; Lajous et al., 2005, respectivamente), 33,8% na Dinamarca

(Kjaer et al., 2005) e 8,7% em Busan, Coréia do Sul (Shin et al., 2004). Recente estudo realizado em conjunto com o Brasil, os Estados Unidos da América e o México, sobre a história natural da infecção pelo HPV em homens saudáveis mostrou prevalências na primeira visita de 72.3%, 61.3% e 61.9%, respectivamente nos três centros de estudo (Giuliano et al., 2008).

Foram relatadas, conforme mencionadas anteriormente, prevalências mais elevadas, 63% a 84%, entre homens que freqüentavam clínicas de doença sexualmente transmissível (Law et al., 1991; Mandal et al., 1991; Wikström et al., 1992). Além disso, a prevalência variou de 13% a 45% entre homens atendidos em clínicas de DST, em diferentes países (Wikström et al., 2000; Svare et al., 2002; Baldwin et al., 2003). Tal variação pode acontecer por diferenças no comportamento sexual e distribuição da idade da população estudada, pela sensibilidade do método de detecção do HPV, pela forma e local de coleta de material. Apesar da magnitude de prevalência na população masculina ser elevada, ao contrário do que ocorre entre mulheres, não se tem estabelecido associação expressiva entre infecção pelo HPV e tumores do aparelho geniturinário. De fato, o carcinoma de pênis é uma neoplasia rara, com incidência mais elevada em países em desenvolvimento, dentre eles, África e Ásia, com 10% a 20% de incidência (Pow-Sang et al., 2002). A freqüência relativa desse tumor, nos Estados Unidos, é de 0,5%, enquanto que no Brasil é de 2,1% (Lopes et al., 2002). Recentemente, Bezerra e colaboradores (2001), analisando 82 amostras preservadas em parafina de câncer de pênis, constataram que um terço dos carcinomas de pênis estava

relacionado ao HPV, e o tipo 16 foi o mais freqüente. A relação entre o câncer de pênis e a infecção pelo HPV precisa de mais dados na literatura para se elucidar a fisiopatologia dessa doença. No Brasil, Favorito e colaboradores (2008), realizaram estudo epidemiológico sobre o câncer de pênis e mostram algumas conclusões iniciais que é uma patologia que afeta predominantemente os indivíduos de baixa renda, brancos, não circuncidados e moradores do norte e nordeste do Brasil.

Há apenas dois estudos relacionados aos homens infectados pelo HIV realizados na Espanha e outro na Alemanha com taxas de prevalências de HPV peniano de 38% e 24%, respectivamente (Sirera et al., 2006; Gomousa-Michael et al., 2000). Um dos novos estudos no Brasil realizado numa clínica de DST, a prevalência do DNA do HPV no pênis, nos indivíduos infectados pelo HIV foi de 59% e naqueles HIV negativo foi de 67% (Silva, 2006).

2.9 – INCIDÊNCIA E PERSISTÊNCIA DA INFECÇÃO PELO HPV EM HOMENS

Em contraste com a grande quantidade de informação sobre a incidência e a duração das infecções pelo HPV em mulheres, muito pouco se sabe sobre a história de infecções no homem. Até o momento existem apenas quatro estudos para a avaliação da infecção pelo HPV na população masculina soronegativa ao HIV, com duração de seguimentos variados e usando a PCR para a identificação do DNA do HPV (Van Doormum et al., 1994; Wikiström et al., 2000; Lajous et al., 2005; Kjaer et al., 2005). Os homens, que foram

testados no início e que foram negativos para HPV, adquiriram o HPV em 13,8% e 22,7% durante o seguimento. Fatores preditores independentes para a aquisição foram às categorias: sexo anal com outro homem (Lajous et al., 2005) e ter mais de três parceiros sexuais desde da última visita clínica (Kjaer et al., 2005). Os fatores independentemente associados com a redução de risco para a aquisição de HPV foram às categorias: uso consistente ou ocasional de preservativo masculino (Kjaer et al., 2005) e alto “status” sócio-econômico (Lajous et al., 2005). Fatores associados com a persistência incluem múltiplos tipos de HPV detectados no início do acompanhamento e não postectomizados (Kjaer et al., 2005; Lajous et al., 2005).

Existem poucos trabalhos na literatura sobre a persistência e eliminação da infecção pelo HPV na população masculina. Além disso, há variabilidade nos métodos empregados, assim como, em relação ao tempo de seguimento bem como a definição do que é a persistência e a eliminação do DNA do HPV, como apresentado a seguir.

O trabalho realizado por Van Doornum e colaboradores (1994) utilizando 365 dias de seguimento definiu **regressão da infecção** como a não detecção do DNA de HPV específico no genital após um resultado positivo a esse teste em uma das visitas iniciais. A **persistência intermediária** da infecção foi definida como a detecção de DNA de HPV tipo específico em duas visitas consecutivas no período de seguimento do estudo. A **persistência longa** da infecção foi caracterizada com a detecção do mesmo tipo de HPV na genitália em três ou mais visitas consecutivas no período de 365 dias sem apresentar

entre as visitas resultados negativos para HPV. Aqueles participantes que apenas foram positivos na primeira ou na última visita foram considerados de **duração e infecção desconhecida**. A **infecção recorrente** foi definida como uma infecção com o mesmo tipo de HPV no genital em diferentes visitas na qual durante o intervalo de uma visita foi negativa e depois positivou com o mesmo tipo da anterior.

Outro artigo de Wikström e colaboradores (2000), em estudo prospectivo em homens assintomáticos para lesões induzidas pelo HPV, no período de até 16 meses. Eles definiram infecção **transiente** naqueles pacientes com pelo menos uma visita de acompanhamento com resultado negativo para HPV após a visita inicial ter sido positiva, isto é, teste de HPV negativo depois de um teste positivo. A **Persistência** de infecção foi definida naqueles indivíduos que continuaram com o mesmo tipo de HPV nas visitas. A **Nova** infecção foi definida naqueles que foram positivos para um novo tipo de HPV. E a infecção **“flutuante”** (*fluctuating infection*) quando o homem estava positivo na primeira visita, negativo na próxima, e positivo na seguinte para o mesmo tipo de HPV.

2.10 - FORMAS DE APRESENTAÇÃO DA INFECÇÃO PELO HPV

Tanto no homem, como na mulher, a infecção pelo HPV tem sido descrita sob três formas de apresentação: clínica, subclínica e latente.

A apresentação clínica mais comum é conhecida como verruga genital ou condiloma. Manifesta-se pela presença de lesão exofítica, com superfície

granulosa, freqüentemente múltipla, da cor da pele, eritematosa ou hiperpigmentada e de tamanho variável. As lesões maiores assemelham-se à “couve-flor” e as menores apresentam-se com aspecto de pápula, placa ou ainda filiformes (Handsfield et al., 1997). – **Figura 6.**



Figura 6. Lesões clínicas de HPV no pênis.

O HPV está mais presente em áreas úmidas, expostas ao atrito durante o coito, ou seja, no homem são mais comuns na glândula, frênulo, corona e prepúcio e nas mulheres, na parte posterior do intróito vaginal, lábio menor, clitóris e lábio maior (Buechener, 2002). No homem, são pouco freqüentes na uretra e, quando existentes, geralmente estão localizadas na uretra distal e meato uretral, podendo haver prurido, ardor, sangramento e obstrução (Kirby, 1987; Oriel, 1971; Levine et al., 1984) – **Figura 7.**



Figura 7. Lesões clínicas de HPV no pênis.

Lesões subclínicas foram inicialmente descritas por Meisels e colaboradores (1977). Nesta forma, a infecção do HPV caracteriza-se por áreas difusas de hiperplasia epitelial não-papilífera da camada germinativa basal e alterações citológicas características. A diferença histológica do condiloma é papilar, enquanto a forma subclínica é plana ou micropapilar (Reid et al., 1984). São muito mais freqüentes que as lesões clínicas, e visualizadas através de peniscopia após aplicação de ácido acético a 5%, o qual coagula e precipita as proteínas intracelulares e se caracteriza como epitélio acetobranco, máculas e pápulas (Siegel e Mellinger, 1992; Brown et al., 1999; Lauro et al., 2000). Troffatter (1997) relatou que a maioria das lesões era subclínica, porém mesmo em mãos experientes, o método por ele utilizado, apresenta baixa especificidade. – **Figura 8.**



Figura 8. Lesões subclínicas, após colocação de ácido acético a 5%.

Na forma latente a infecção de HPV só pode ser diagnosticada por meio de técnicas de biologia molecular, não havendo evidências clínicas, citológicas, histológicas ou peniscópicas (Richart & Wright, 1991; Siegel e Mellinger, 1992; Lauro et al., 2000). Na latência, acredita-se que o DNA viral encontra-se na forma epissomal, aparentemente, sem atividade e replicando-se apenas uma vez a cada ciclo celular. Como a infecção nessa fase não é produtiva não existem alterações citológicas decorrentes de sua presença. Não são conhecidos os mecanismos pelos quais o HPV permanece nesse estado. Provavelmente, fatores imunológicos são determinantes dessa condição. Seu significado biológico é desconhecido e não se sabe quanto tempo o vírus pode permanecer nesse estado, nem quantos casos progredem dessa forma de infecção. Segundo Ferenczy (1993), a presença do HPV em tecidos normais seria responsável pela recorrência de lesões, apesar dos tratamentos.

2.11 – CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DAS LESÕES INDUZIDAS PELA INFECÇÃO DO HPV

Existe um espectro heterogêneo de anormalidades e atípicas de lesões que afetam o epitélio escamoso do pênis. São caracterizadas por espessamento do epitélio escamoso ou a presença de alterações, como a proliferação celular, perda de polaridade, maturação anormais e diferentes graus de atipia nuclear (Cubilla et al., 2000). Semelhantes a outros sítios genitais, a terminologia utilizada para definir as lesões é variável.

As principais alterações histológicas induzidas pela infecção do HPV são as alterações nucleares tais como aumento do volume, do número, hipercromasia (discariose), disceratose e, principalmente, a coilocitose, que se caracteriza pela presença de vacúolos perinucleares (Oriel, 1990). Uma das características da infecção pelo HPV é o aparecimento de células coilocitóticas nas camadas superficiais do epitélio escamoso. Estes coilócitos são células epiteliais escamosas que contêm um núcleo hipercromático, acêntrico devido ao deslocamento por um grande vacúolo perinuclear. **Figura 9.**

Meisels e colaboradores (1977) consideraram que a coilocitose era uma alteração quase que patognomônica da infecção pelo HPV quando correlacionaram os aspectos citológicos, colposcópicos e histopatológicos nas lesões genitais condilomatosas. No entanto, a gênese do vacúolo citoplasmático manteve-se pouco claro, especialmente porque ambos a

replicação do DNA do HPV e a montagem viral ocorrem exclusivamente no núcleo.

Na biópsia das lesões clínicas, a coilocitose é observada em ambas as infecções causadas pelo HPV de baixo e alto risco e, portanto, Krawczyk et al., demonstraram que as proteínas, E5 e E6, de HPV de baixo e alto risco cooperam para induzir a formação de coilocitose em células cervicais humanas *in vitro* e também nos queratinócitos de prepúcio humanos (Krawczyk et al., 2008).

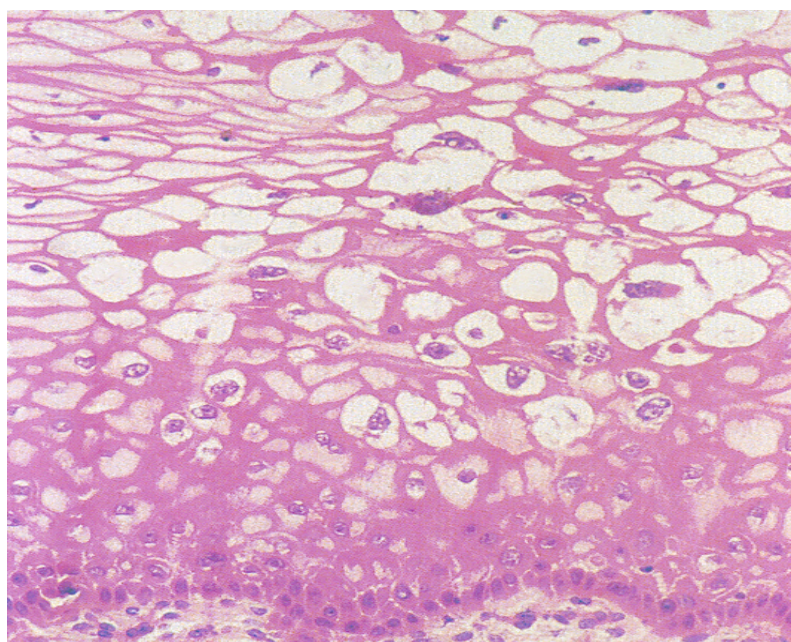


Figura 9. Coilocitose. Fonte: Gross & Barrasso, 1999.

Outra alteração histológica induzida pela infecção do HPV é caracterizada pela arquitetura do epitélio que pode variar de acordo com o tipo e maturação do mesmo, fatores do hospedeiro e tipo e quantidade de vírus

acometido. O HPV induz a hiperplasia epitelial, sobretudo nas células parabasais, ocorrendo graus variáveis de **acantose** (figura 10) definida como espessamento do epitélio de proliferação das células das camadas profundas e **papilomatose** (figura 10), devido à projeção do estroma acima da superfície epitelial, muitas vezes formando eixos contendo vasos proeminentes. Também em consequência dessa infecção ocorre alteração na queratização. O mais freqüente é a **paraqueratose** (figura 11) caracterizada com a presença de uma ou mais camadas na superfície epitelial de células achatadas com citoplasma pequeno e eosinofílico e núcleos com cromatina densa tendendo a picnótica (Bibbo e Moraes Filho, 1998).

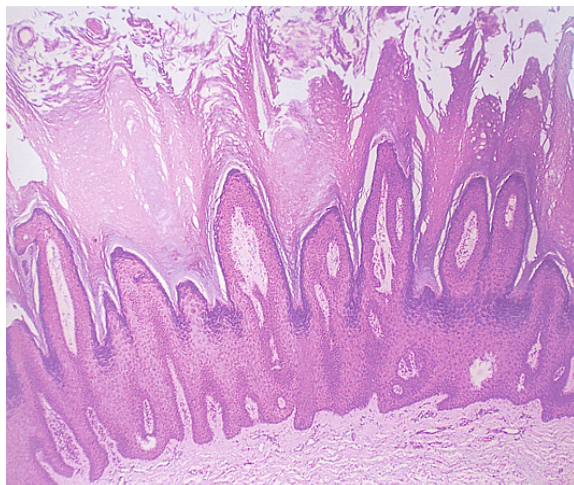


Figura 10 -- Papilomatose e acantose
Fonte: Gross & Barrasso, 1999.

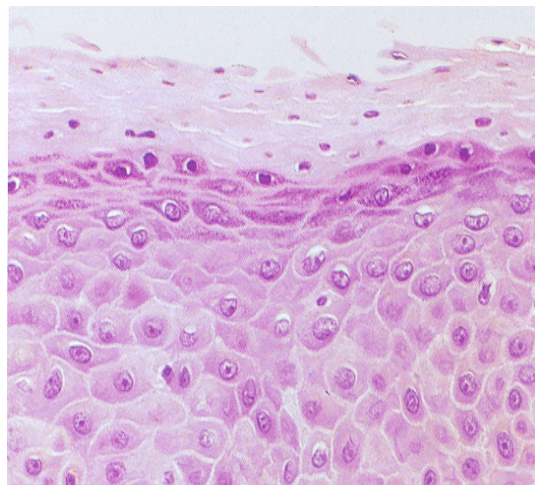


Figura 11- Paraqueratose

A terminologia usada para designar lesões pré-neoplásica peniana tem variação de definição que varia conforme os estudos, como Doença de Bowen, eritroplasia de Queyrat, displasia leve, moderada e severa, carcinoma *in situ*, neoplasia intra-epitelial peniana (PIN) grau I, II e III; lesão epitelial escamosa de baixo (SIL) e alto grau (HIL) (Cubilla et al., 2000).

2.12 - CO-INFECÇÃO HIV E HPV

Outra doença sexualmente transmissível de grande impacto social e médico é a infecção pelo HIV. De 1980 a junho de 2007, foram notificados 474.273 casos de aids no país. Nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, a incidência da doença tende à estabilização. Porém, no Norte e no Nordeste, a tendência é de crescimento (Boletim Epidemiológico-Aids e DST, 2008).

O HIV-1 é um lentivírus que possui genes reguladores e estruturais. É constituída por dupla fita de RNA, coberta por uma camada lipoprotéica, o capsídeo, chamado de core viral, composto pelas proteínas p19, p24 e p55, codificadas pelo gene *gag*, um envelope glicoprotéico (gp41, gp120), codificado pelo gene *env*, e as enzimas transcriptase reversa (p66), protease (p55) e integrase (p31), codificadas pelo gene *pol*. Como nos outros retrovírus, nas porções finais do genoma do HIV-1, podem ser observadas seqüências repetidas terminais (LTR), que controlam a expressão dos outros genes do HIV. Além dessas proteínas estruturais, vários genes reguladores são observados,

como *tat*, *rev* e *nef*, que controlam a replicação viral, quando ativados (Levy, 1995).

Estudos mostram a possibilidade do HIV influenciar diretamente na expressão do HPV através de interações moleculares entre os genes virais. A proteína transativadora do HIV-1, a (*tat-1*) tem múltiplas funções regulatórias *in vitro*. A *tat-1* pode estimular o crescimento das células do sarcoma de Kaposi, inibir a proliferação celular *in vitro* e transativar vários promotores virais. De fato, a proteína reguladora do HIV (gene *tat-1*) pode atuar sobre a E2 do HPV 16, levando ao aumento da expressão do HPV em pacientes co-infectados. Demonstrou-se que a *tat-1* interage com a região regulatória (NCR ou LCR) do HPV 16 e reverte repressão mediada pelo E2 (Vernon, 1993). Isto proporciona um mecanismo potencial para explicar a expressão genética intensificada do HPV em mulheres infectadas pelo HIV.

Entretanto, deve-se enfatizar que, quando se considera o potencial da interação molecular direta entre o HIV e o HPV, estes dois vírus não co-infectam células epiteliais do colo uterino. Pomerantz e colaboradores (1998), empregando a imuno-histoquímica, demonstraram antígenos do HIV em um número considerável de monócitos, macrófagos e células endoteliais, dentro da submucosa do colo uterino, porém apenas um pequeno número de células infectadas pelo HIV, assemelhando-se a linfócitos, foi observado na mucosa do colo uterino. Esses achados imuno-histoquímicos, subseqüentemente, foram confirmados por um estudo, empregando PCR *in situ*, que não conseguiu detectar material genético do HPV ou HIV no epitélio escamoso do colo uterino

(Nuovo et al., 1993). O HIV produz, progressivamente, deterioração local da imunidade celular, diminuição dos linfócitos T CD4+ e das células de Langerhans na pele (Chopra et al., 1997). Adicionalmente, a infecção crônica do HPV pode potencializar a patogênese do HIV, demonstrada através da baixa taxa de TNF-alfa na secreção vaginal juntamente com aumento da produção de citocinas inflamatórias (IL-1 e IL-6) pela indução da replicação viral do HIV em células de linhagem linfáticas (Gage, 2000; Zara et al., 2008).

Conforme descrito acima, fica evidente a necessidade de estudar a infecção pelo HPV nos homens, principalmente, na população vivendo com HIV/aids. Assim, delimitou-se como objeto de investigação do presente trabalho, a identificação da história natural da infecção pelo HPV no pênis em uma população determinada, circunscrita a um centro de referência e treinamento em DST/AIDS da rede pública de saúde, em São Paulo, tendo como população de estudo, homens tanto soropositivos, quanto soronegativos ao HIV.

3 - OBJETIVO GERAL

Determinar a persistência e eliminação de DNA de HPV no pênis de homens HIV positivos e negativos.

3.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Determinar as freqüências de persistência, aquisição e a eliminação de DNA de HPV no pênis de homens soropositivos e soronegativos para o HIV;

b) Correlacionar lesões clínicas e subclínicas quanto à histologia e presença de DNA HPV;

c) Comparar a aquisição, persistência, eliminação e ausência da infecção pelo HPV com as variáveis relacionadas à infecção pelo HIV, quais sejam, carga viral plasmáticas do HIV, contagem de células T CD4 e uso de anti-retrovirais (HAART).

4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 - TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional, longitudinal – coorte prospectiva.

4.2. LOCAL DO ESTUDO

O Centro de Referência e Treinamento de DST/AIDS do Programa Estadual de DST/AIDS do Estado de São Paulo possui um ambulatório de DST, que atende casos índices e seus parceiros sexuais. Conta, também, com um ambulatório da Especialidade, que atende casos de urologia geral para os pacientes com HIV/aids. No período de recrutamento, os dois núcleos do ambulatório atenderam aproximadamente 1200 pacientes.

4.3 - POPULAÇÃO DE ESTUDO

O estudo longitudinal envolveu uma população, não probabilística de 144 pacientes do sexo masculino, com idade entre 18 e 70 anos, que procuraram o ambulatório do CRT-DST/AIDS, São Paulo, e que foram acompanhados, distribuídos em dois grupos. Desses, 72/144 (50%) eram parceiros de mulheres com provável patologia associada à infecção pelo HPV por meio da

citologia, histologia ou colposcopia, que foram encaminhados, mediante referência, para o ambulatório de DST para realização da peniscopia, os quais, ao serem testados para HIV, apresentaram resultado negativo, constituindo, assim, o grupo HIV negativo. Os outros 72 homens, constituindo o grupo HIV positivo, eram pacientes atendidos no núcleo da especialidade de urologia, do CRT-DST/AIDS, e que apresentavam queixas urológicas variadas e/ou lesão de pênis. Assim, para inclusão na população de estudo, foram adotados os seguintes critérios:

- Homens adultos, de 18 anos e/ ou mais, não infectados pelo HIV, com suspeita de HPV, encaminhados para realização de peniscopia;
- Homens soropositivos para o HIV, atendidos no núcleo da especialidade de urologia, do CRT-DST/AIDS;
- Ser residente em São Paulo;
- Aceitação da participação voluntária no estudo, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram utilizados como critérios de exclusão, apresentar:

- Idade menor de 18 anos;
- Diagnóstico prévio de câncer de pênis ou de ânus;
- Tratamento prévio de quimioterapia;
- Antecedentes de uso de interferon;
- Transplante renal e hematológico;
- Não estar de acordo com o TCLE e ou não assiná-lo.

4.4 - ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi realizado, após a apreciação e aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa do Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS do Programa Estadual de São Paulo e do Hospital das Clínicas /FMUSP.

A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, TCLE, e os dados para preenchimento do instrumento de avaliação sócio-comportamental (epidemiológica) foram obtidos posteriormente ao convite e aceitação da participação livre e esclarecida, por parte de pacientes, em entrevista individual, quando de seu comparecimento à consulta médica realizada na fase de dissertação do mestrado intitulado “Prevalência da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em homens soropositivos para HIV e homens parceiros de mulheres com infecção pelo HPV” realizada no Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da universidade de São Paulo com defesa pública no dia 07 de março de 2006.

4.5 – PROCEDIMENTOS

No período entre fevereiro de 2004 a fevereiro de 2005, todos os indivíduos (soropositivos e soronegativos ao HIV) que foram convidados e aceitaram participar assinando o TCLE dessa pesquisa foram submetidos, nas quatro visitas

com intervalos por ocasião da entrada do indivíduo no estudo, após 30 dias, aos 60 dias e aos 180 dias, a anamnese, que implicou em preenchimento de um formulário pelo pesquisador (Dissertação de mestrado do autor, 2006); exame físico geral e do genital, peniscopia, coleta de células de todo o pênis, biópsia quando necessário.

No exame físico genital, foi avaliada, sem magnificação, a presença, ou não, de lesões verrucosas no pênis, meato uretral, região pubiana, pele escrotal e região perianal. Em seguida, os voluntários foram submetidos a peniscopia.

4.5.1 – PENISCOPIA

O diagnóstico da forma subclínica da infecção pelo HPV foi realizado por meio da peniscopia (Baggish, 1982; Levine et al., 1984). Este exame é análogo a colposcopia e consiste na visualização da genitália externa, com colposcópico (D.F.V. Vasconcellos, São Paulo, Brasil) de aumento de 13 vezes, inicialmente, sem a aplicação de ácido acético. No segundo momento, fez-se a aplicação de gazes que foram embebidas após borrifação com ácido acético a 5%, em quantidade suficiente para envolver toda a região peniana. Estas devem permanecer no local a ser examinado, por um período de 5 minutos. O ácido acético coagula e precipita as proteínas intracelulares, revela lesões brancas ou acentua lesões com relevos, e é reversível.

Após esse tempo, as gazes foram retiradas, quando foi possível observar a presença ou não de lesões maculares e papulares esbranquiçadas. Estas lesões foram denominadas de lesões acetobranças, segundo Wikström (1992).

4.5.2 - COLETA DE CÉLULAS EM TODAS AS VISITAS

Após a peniscopia, com ácido acético, foram realizados raspados da genitália externa para a obtenção de células, utilizando escova de coleta de endocérvice para Papanicolaou, por cerca de 10 vezes, no sentido da glândula para o prepúcio, indo da região ventral direita para a esquerda, circundando todo o pênis. A escova foi colocada em tubos, tipo Ependorf, com cerca de 1ml de solução salina a 0,9%, previamente identificada e armazenada, inicialmente em nitrogênio líquido e depois a -70°C. Posteriormente, o material foi encaminhado ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, para ser submetido a PCR para a detecção do DNA do HPV e Hibridização em pontos.

4.5.3 - BIÓPSIA

Para a realização da biópsia, anestesiou-se o local com xilocaína a 1%, sem vasoconstritor, com agulha de insulina. A infiltração do anestésico foi subcutânea, logo abaixo da lesão, com a finalidade, além da anestesia, de elevá-la e facilitar sua exérese com pinça de Gaylor-Medina. Logo após a retirada da lesão, o local foi tratado usando uma haste, com uma das

extremidades contendo algodão embebido em ácido metacresolsulfônico concentrado (Albocresil®).

Parte do material, previamente identificado, fixado em formol a 10%, foi posteriormente, enviado ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, para ser submetido a exame histopatológico. Outra parte foi colocada em 1ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%, armazenado a -70°C e, mais tarde, encaminhado ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, para ser submetido a PCR para a detecção do DNA do HPV e Hibridização em pontos, conforme descrito anteriormente.

4.5.4 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES CLÍNICAS E ACETOBRANCAS PENIANAS

Esta forma de diagnóstico também se baseia no efeito do vírus sobre as células e tecidos infectados, sem identificar propriamente o vírus. Todo material de biópsias da genitália masculina dos dois grupos foi encaminhado ao Instituto Adolfo Lutz (IAL), da Secretaria de Estado da Saúde - São Paulo. Todo material biológico submetido ao exame histopatológico foi previamente identificado e fixado em solução de formol líquido saturado a 10%. As lâminas foram preparadas conforme a rotina estabelecida, que consistiu da desidratação em álcool etílico, clareamento pelo xilol e impregnação e inclusão em parafina, seguidos de cortes histológicos por microtomia manual, com espessura de cinco micrômetros, e a seguir foram coradas pela hematoxilina-eosina e analisado pela

microscopia óptica para diagnóstico histopatológico. A seguir, as mesmas lâminas foram encaminhadas para leitura detalhada para fins do estudo, por dois patologistas que não tinham informações sobre a identificação da amostra, exceto que eram procedentes de pênis. São eles: Dra. Ilana Halpern Salomon do Departamento de Dermatologia, e Dr. Kleber Simões do Espírito Santo, do departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina da USP. Uma vez que os critérios diferiram entre Departamentos, um reflexo de que não há consenso na definição das lesões associadas a HPV em biópsias penianas, optamos por mostrar os resultados separadamente.

No Departamento de Dermatologia, analisaram-se todas as lâminas do estudo levando em consideração os seguintes parâmetros de classificação: **Compatível para lesão induzida pelo HPV** definido como alterações citológicas com coilocitose típica (halos claros perinucleares, núcleos hiper cromáticos, contornos nucleares bastante irregulares, binucleação), podendo estar associadas às alterações arquiteturais, hiperqueratose (orto ou paraqueratose), acantose, papilomatose e capilares proliferados nas papilas mais alterações citológicas sugestivas.

Sugestivo para lesão induzida pelo HPV: definido como alterações citológicas sugestivas: halo perinuclear, núcleos ocasionalmente hiper cromáticos e de contornos irregulares (nas camadas mais superficiais). Alterações arquiteturais sugestivas: hiperqueratose (orto ou paraqueratose), acantose, papilomatose e capilares proliferados nas papilas, podendo ou não estar associadas a alterações citológicas sugestivas.

Inflamatória: Ausência de alterações citoarquiteturais sugestivas. Presença de uma ou mais das características: hiperqueratose, acantose, exocitose focal de neutrófilos, infiltrado inflamatório linfomononuclear dérmico (perivascular ou liquenóide), derrame pigmentar, infiltrado inflamatório polimorfonuclear.

Os critérios adotados no Departamento de Patologia foram:

- 1- Inflamação aguda: ausente ou presente;
- 2-Inflamação crônica: ausente, leve/moderada ou acentuada;
- 3-Displasia: ausente, baixo grau ou alto grau;
- 4-Alterações citopáticas pelo HPV (coilocitose): ausente ou presente;
- 5-Papilomatose: ausente ou presente;
- 6-Paraqueratose: ausente, focal ou difusa;

4.4.5 -TESTE DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA HPV

As metodologias da extração do DNA total, amplificação do gene β -globina humana e do DNA do HPV, e tipagem dos 43 tipos de papilomavírus humano das amostras obtidas com escova e por biópsia que foram realizadas no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer estão descritas no anexo 1.

4.4.5-ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tipo de amostra, utilizado pelo estudo, foi não probabilística. Utilizou-se o programa “Epi-Info”, versão 6.04; CDC, Atlanta, GA, para informatização dos dados e análise estatística. A análise inicial foi realizada por meio de frequências simples. O Teste χ^2 Pearson foi utilizado para a comparação dos dados das categorias estudadas. A análise de significância foi realizada por meio do cálculo determinados das razões de chance ou “Odds ratio” (OR), corrigido com testes Yates, com intervalo de confiança de 95%, foi derivada dos modelos proporções de risco de Cox, usando “software” “Epi-Info”. Para o estudo optou-se por considerar como associações significativas $p \leq 0,05$.

A taxa de **incidência** presumida da infecção pelo HPV e/ou tipos foi calculada usando o número de casos no qual certo tipo de HPV fora detectado entre aqueles homens que não apresentavam DNA de HPV no início do estudo. O tempo de seguimento foi de seis meses para todos os integrantes.

Os critérios de incidência, persistência, aquisição e eliminação da infecção pelo HPV foram **arbitrariamente** definidos de acordo com dados da literatura e observação desta série de casos (Van Doornum et al.,1994 e Wikström et al., 2000).

A **persistência** foi definida como tendo a presença de DNA de HPV durante duas ou mais visitas consecutivas de seguimento.

A **eliminação** foi definida como a ausência de DNA de HPV que fora detectado em uma das visitas iniciais durante o seguimento e permaneceu com o teste de DNA de HPV negativo até a última visita.

A **aquisição** de uma nova infecção foi definida ao se detectar o DNA do HPV após uma ou mais visita do seguimento com teste anterior negativo para o DNA do HPV.

5-RESULTADOS

O estudo envolveu 144 homens adultos, onde 72 (50%) foram oriundos do ambulatório de DST e que, ao serem testados para HIV, apresentaram resultado negativo (grupo HIV negativo). Os outros 72 homens foram provenientes do ambulatório da Especialidade de Urologia, do mesmo centro, e que atende portadores do HIV/AIDS, com queixas variadas, constituiu o grupo HIV positivo.

5.1 - DADOS DEMOGRÁFICOS

Participaram 144 homens nesse estudo, com idade média de 36,5 anos, variando entre 18 e 66 anos. A maioria dos pacientes pertencia à raça branca (53,5%), seguido de mulato (19,4%), negro (5,6%), amarelo (0,7%), e outras raças (20,8%).

Quanto à escolaridade, apenas um paciente (0,7%) não possuía qualquer grau de escolaridade, 13,9% estudaram da 1ª até 4ª série, 25 % da 5ª à 8ª série, 44,4% estudaram até o 2º grau e 16,0% possuíam grau universitário. Com relação ao estado civil, mais da metade dos pacientes eram solteiros (56,3%), e 36,8% eram casados ou amigados; os demais eram separados, desquitados, divorciados ou viúvos (6,3%). Um paciente não informou o estado civil. (Dissertação de Mestrado do autor, 2006) (anexo 2).

5.2- AVALIAÇÕES DO COMPARECIMENTO E DO RASPADO PENIANO NAS QUATRO VISITAS

Tanto o grupo de homens soropositivos e negativos para HIV apresentou um comparecimento maior nas três primeiras visitas durante a coorte. No total de visitas realizadas observamos que os grupos foram semelhantes na aderência ao comparecimento do estudo. **Tabela 1.**

Tabela 1 - Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo com o comparecimento nas visitas.

Visita Dias	HIV POSITIVOS n (%)	HIV NEGATIVOS n (%)
zero	72 (100)	72 (100)
30	62 (86)	67 (93)
60	56 (78)	52 (72)
180	42 (58)	43 (60)
Total de visitas completadas	232 (81)	234 (81)
Total de visitas esperadas	288 (100)	288 (100)

X^2 Pearson = 0,35 $P = 0,951$

Durante o seguimento foram colhidas células penianas em que a frequência de positividade para o DNA de HPV por visita encontra-se na **tabela 2** não apresentando diferenças nos dois grupos. A taxa de positividade do gene da globina foi de 92% das 420 amostras coletadas pela escovação, estando de acordo com os dados da literatura (Partidge et al., 2007; Giuliano et al., 2008).

Tabela 2 - Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo dos resultados do DNA do HPV **por visita.**

Visita (dias)	HIV POSITIVO			HIV NEGATIVO		
	HPV POSITIVO n (%)	HPV NEGATIVO n (%)	Total n (%)	HPV POSITIVO n (%)	HPV NEGATIVO n (%)	Total n (%)
zero ^a	39 (60)	26 (40)	65 (100)	43 (66)	22 (34)	65 (100)
30 ^b	38 (69)	17 (31)	55 (100)	40 (65)	22 (35)	62 (100)
60 ^c	30 (64)	17 (36)	47 (100)	30 (64)	17 (36)	47 (100)
180 ^d	27 (69)	12 (31)	39 (100)	22 (55)	18 (45)	40 (100)
Total	134 (65)	72 (35)	206 (100)	135 (63)	79 (37)	214(100)

^a Em sete pacientes HIV+ e sete do grupo HIV- não foi realizada PCR.

^b Em sete pacientes HIV+ e cinco do grupo HIV-não foi realizada PCR.

^c Em nove pacientes HIV+ e cinco do grupo HIV - não foi realizada PCR.

^d Em três pacientes HIV+ e três do grupo HIV-não foi realizada PCR.

X² Pearson = 0,75 P = 0,86

Tabela 3 - Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo com a persistência, a eliminação, a aquisição e ausência do DNA do HPV durante a coorte.

Categoria	HIV positivo n (%)	HIV negativo n (%)	Total n (%)
Persistência	41 (53)	37 (47)	78 (100)
Eliminação	9 (38)	15 (62)	24 (100)
Aquisição	12 (55)	10 (45)	22 (100)
Ausência	9 (41)	13 (59)	22 (100)

X² Pearson = 2,51 P = 0,474

Não houve associação estatisticamente significativa nos dois grupos em relação às categorias de persistência, eliminação do DNA de HPV, aquisição ou mesmo ausência de HPV (nunca teve a infecção) durante as quatro visitas. **Tabela 3.**

Tabela 4 - Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo com os tipos de HPV segundo a oncogenicidade.

Tipos de HPV	HIV positivo n (%)	HIV negativo n (%)	Total n (%)
Não-oncogênico	6 (13,64)	15 (34,9)	21 (24,1)
Oncogênico	24 (54,6)	21 (48,8)	45 (51,8)
Ambos	14 (31,8)	7 (16,3)	21 (24,1)
Total	44 (100,0)	43 (100,0)	87 (100,0)

X^2 Pearson = 6,3798 P = 0,041

Durante a coorte, o grupo HIV positivo apresentou uma maior frequência dos tipos oncogênicos de HPV em relação ao grupo HIV negativo com significado estatístico. **Tabela 4.**

Os oito tipos de HPV mais frequentes encontrados no grupo HIV positivo foram **16** (10%), **6** (7,4%), **84** (6,7%), **52** (6,3%), **11** (5,2%), **33** (4,8%), **18** (4,8%) e **55** (4,5%). No entanto, no grupo HIV negativo foram os tipos **6** (27%), **51** (11,2%), **84** (9,6%), **16** (9,0%), **73** (3,7%), **53** (3,7%), **52** (3,7%) e **11** (3,7%). **Tabela 5.**

Tabela 5 - Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo com os tipos de HPV.

Tipos HPV	HIV positivo n (%)	HIV negativo n (%)	TOTAL n (%)
Alto risco			
16	27 (10)	17 (9,0)	44 (9,6)
51	10 (3,7)	21 (11,2)	31 (6,8)
52	17 (6,3)	7 (3,7)	24 (5,3)
18	13 (4,8)	5 (2,7)	18 (3,9)
73	10 (3,7)	7 (3,7)	17(3,7)
33	13 (4,8)	-	13 (2,8)
56	8 (3,0)	4 (2,1)	12 (2,6)
53	4 (1,5)	7 (3,7)	11 (2,4)
31	7 (2,6)	3 (1,6)	10 (2,2)
66	6 (2,2)	4 (2,1)	10 (2,2)
39	6 (2,2)	4 (2,1)	10 (2,2)
58	5 (1,9)	4 (2,1)	9 (2,0)
68	8 (3)	1 (0,5)	9 (2,0)
35	7 (2,6)	-	7 (1,5)
59	5 (1,9)	1 (0,5)	6 (1,3)
82	4 (1,5)	1 (0,5)	5 (1,1)
45	1 (0,4)	-	1 (0,3)
26	-	2 (1,1)	2 (0,4)
Baixo risco			
6	20 (7,4)	50 (27)	70 (15)
11	14 (5,2)	7 (3,7)	21 (4,6)
40	9 (3,5)	-	9 (2,0)
42	9 (3,5)	-	9 (2,0)
81	2 (0,7)	-	2 (0,4)
54	2 (0,7)	5 (2,7)	7 (1,5)
61	1 (0,4)	3 (1,6)	4 (0,9)
72	4 (1,5)	-	4 (0,9)
70	3 (1,1)	-	3 (0,6)
Risco não definido			
84	18 (6,7)	18 (9,6)	36 (7,9)
55	12 (4,5)	3 (1,6)	15 (3,3)
62	9 (3,5)	6 (3,2)	15 (3,3)
83	7 (2,6)	2 (1,1)	9 (2,0)
89	-	4 (2,1)	4 (0,9)
69	1 (0,4)	-	1 (0,3)
71	1 (0,4)	-	1 (0,3)
Não identificado	6 (2,2)	2 (1,1)	8 (1,7)
Total	269 (100)	188 (100)	457 (100)

Tabela 6 - Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo com as infecções simples e múltiplas pelo HPV.

Infecção pelo HPV	HIV positivo n (%)	HIV negativo n (%)	Total n (%)
Simple	24 (53,3)	33 (73,3)	57 (63,3)
Múltipla	21 (46,7)	12 (26,7)	33 (36,7)
Total	45 (100,0)	45 (100,0)	90 (100,0)

X² Pearson = 3,8756 P = 0,049

O grupo HIV positivo também apresentou uma maior frequência de múltiplos tipos de HPV em relação ao grupo HIV negativo durante o seguimento de 180 dias, sendo estatisticamente significativo. **Tabela 6.**

Visando comparar as categorias de aquisição, persistência, eliminação e a ausência da infecção pelo HPV com as variáveis relacionadas à infecção pelo HIV, como, carga viral plasmática do HIV, contagem de linfócito T CD4 e uso de medicação antiviral contra o HIV (HAART). Observamos que houve significância estatística nos homens soropositivos ao HIV em relação ao uso de HAART, com alta carga viral do HIV (>1000 cópias) e baixa contagem de linfócito T CD4 (<200 células) para as categorias de persistência e a aquisição. Além disso, nas categorias, aquisição e ausência da infecção pelo HPV, houve significância estatística naqueles que não estavam usando HAART, com baixa carga viral plasmática de HIV (<1000 cópias) e alto nível de linfócito T CD4 (>200 células).

Tabela 7.

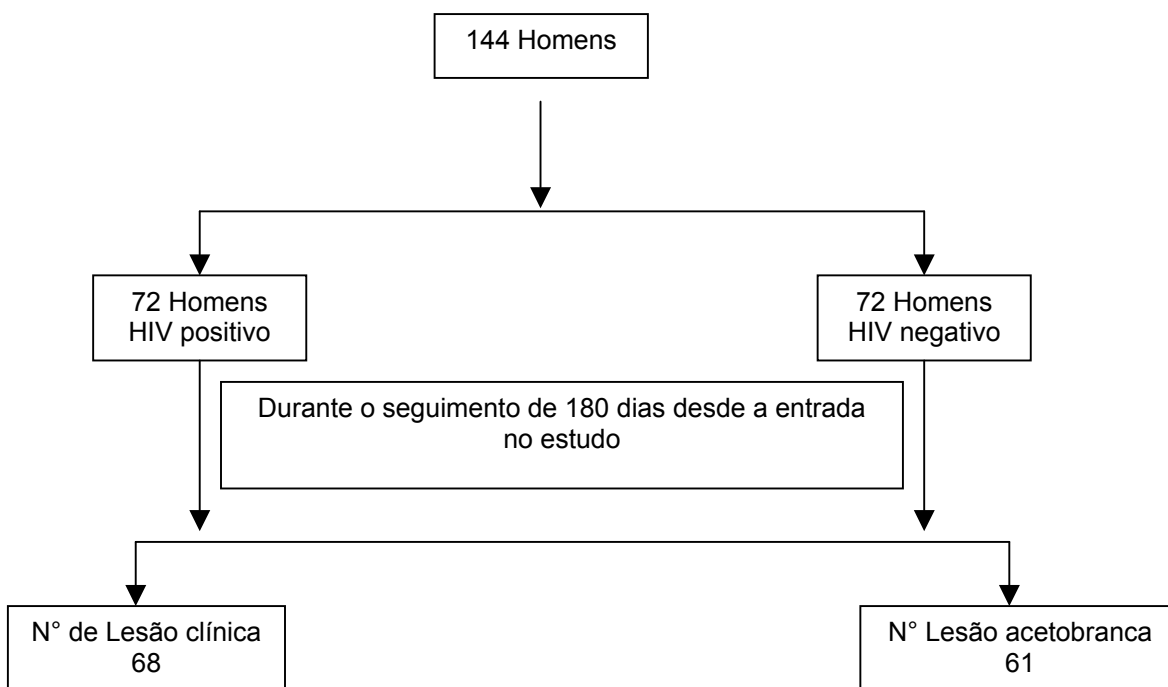
Tabela 7. Distribuição do número e porcentagem dos casos, no grupo HIV negativo, de acordo com a persistência, aquisição, eliminação e ausência da infecção pelo HPV com HAART, carga viral plasmática do HIV e linfócito T CD4.

		Persistência	Ausência da infecção	Aquisição	Eliminação
HAART					
	Sim	22 (76%)	5 (56%)	8 (67%)	9 (100%)
	Não	7 (24%)	4 (44%)	4 (33%)	0
^a Carga viral plasmática HIV					
	≤1000	16 (55%)	6 (75%)	9 (75%)	8 (100%)
	>1000	13 (45%)	2 (25%)	3 (25%)	0
^b Linfócito T CD4					
	≤200	11(38%)	0	0	1 (11%)
	>200	18 (62%)	8 (100%)	12 (100%)	8 (89%)
		X ² Pearson=10 P=0,009	X ² Pearson=7 P=0,038	X ² Pearson=13 P=0,002	X ² Pearson=22 P<0,000

a e b: ausência de resultados de carga viral do HIV e da contagem de linfócito T CD4 em um participante da pesquisa

5.3- AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICO DAS LESÕES CLÍNICA E SUBCLÍNICA DO PÊNIS

O fluxograma 1, abaixo mostra os achados das lesões clínicas e acetobranças por meio da peniscopia durante o seguimento de 180 dias que foram biopsiadas para as análises histológica.



Não houve associação estatisticamente significativa nas características histológicas das lesões clínicas e acetobranças nos genitais dos homens soropositivos e negativos para HIV, segundo critérios adotados pelo patologista do Departamento de Patologia. **Tabela 8.**

Tabela 8 - Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo com a histopatologia das lesões clínicas e acetobranças segundo os critérios do Departamento de Patologia.

HISTOLOGIA	HIV-POSITIVO	HIV-NEGATIVO	TOTAL
Inflamação Aguda	n (%)	n (%)	n
Ausente	40 (82)	64 (80)	104
Presente	9 (18)	16 (20)	25
	X ² Pearson=0,05	P=0,821	
Inflamação Crônica			
Ausente	6 (12)	10 (13)	16
Leve/moderada	42 (86)	63 (78)	105
Acentuada	1 (2)	7 (9)	8
	X ² Pearson=2,39	P=0,303	
Displasia			
Ausente	34 (69)	65 (81)	99
Baixo grau	13 (27)	15 (19)	28
Alto grau	2 (4)	-	2
	X ² Pearson=4,67	P=0,097	
Coilocitose			
Ausente	19 (39)	41 (51)	60
Presente	30 (61)	39 (49)	69
	X ² Pearson=1,89	P=0,17	
Papilomatose			
Ausente	21 (43)	39 (49)	60
Presente	28 (57)	41 (51)	69
	X ² Pearson=0,42	P=0,517	
Paraqueratose*			
Ausente	5 (10)	16 (20)	21
Focal	33 (69)	57 (71)	90
Difusa	10 (21)	7 (9)	17
	X ² Pearson=5,00	P=0,082	
TOTAL	49 (100)	80 (100)	129

*Faltou a análise de uma lesão proveniente do grupo HIV positivo.

Comparando as lesões clínicas com as lesões acetobranças, as características mais importantes e estatisticamente significativas foram a coilocitose e a papilomatose, segundo os critérios adotados pelo patologista do Departamento de Patologia. **Tabela 9.**

Tabela 9 - Distribuição do número e porcentagem das lesões clínicas e acetobranças, de acordo com os critérios histológicos do Departamento de Patologia.

HISTOLOGIA	Lesão clínica	Lesão acetobranca
Inflamação Aguda	n (%)	n (%)
Ausente	51 (75)	53 (87)
Presente	17 (25)	8 (13)
	X^2 Pearson=2,20	P=0,089
Inflamação Crônica		
Ausente	8 (12)	8 (13)
Leve/moderada	56 (82)	49 (80)
Acentuada	4 (6)	4 (7)
	X^2 Pearson=0,09	P=0,957
Displasia		
Ausente	47 (69)	52 (85)
Baixo grau	19 (28)	9 (15)
Alto grau	2 (3)	-
	X^2 Pearson=5,46	P=0,065
Coilocitose		
Ausente	21 (31)	39 (64)
Presente	47 (69)	22 (36)
	X^2 Pearson=14,01	P<0,000
Papilomatose		
Ausente	15 (22)	45 (74)
Presente	53 (78)	16 (26)
	X^2 Pearson=34,29	P<0,000
Paraqueratose*		
Ausente	9 (13)	12 (20)
Focal	52 (76)	38 (63)
Difusa	7 (10)	10 (17)
	X^2 Pearson=2,65	P=0,266
TOTAL	68 (100)	61 (100)

*Faltou a análise de uma lesão acetobranca.

Não houve associação estatisticamente significativa na classificação histológica das lesões clínicas e acetobranças nos genitais dos homens soropositivos e negativos para HIV, segundo os critérios da patologista do Departamento de Dermatologia. **Tabela 10.**

Tabela 10 - Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo com a histopatologia das lesões clínicas e acetobranças segundo a classificação do Departamento de Dermatologia.

Classificação	HIV positivo n (%)	HIV negativo n (%)	Total n (%)
Compatível	15 (31)	11 (14)	26 (20)
Sugestivo	13 (26)	31 (39)	44 (34)
Inflamatório	21 (43)	38 (47)	59 (46)
Total	49 (100)	80 (100)	129 (100)

X^2 Pearson = 5,76 $P = 0,056$

As classificações, compatível e sugestivo, apresentaram associação estatisticamente significativa em relação à lesão clínica comparada com a lesão acetobranca, segundo os critérios adotados pela patologista do Departamento de Dermatologia. **Tabela 11.**

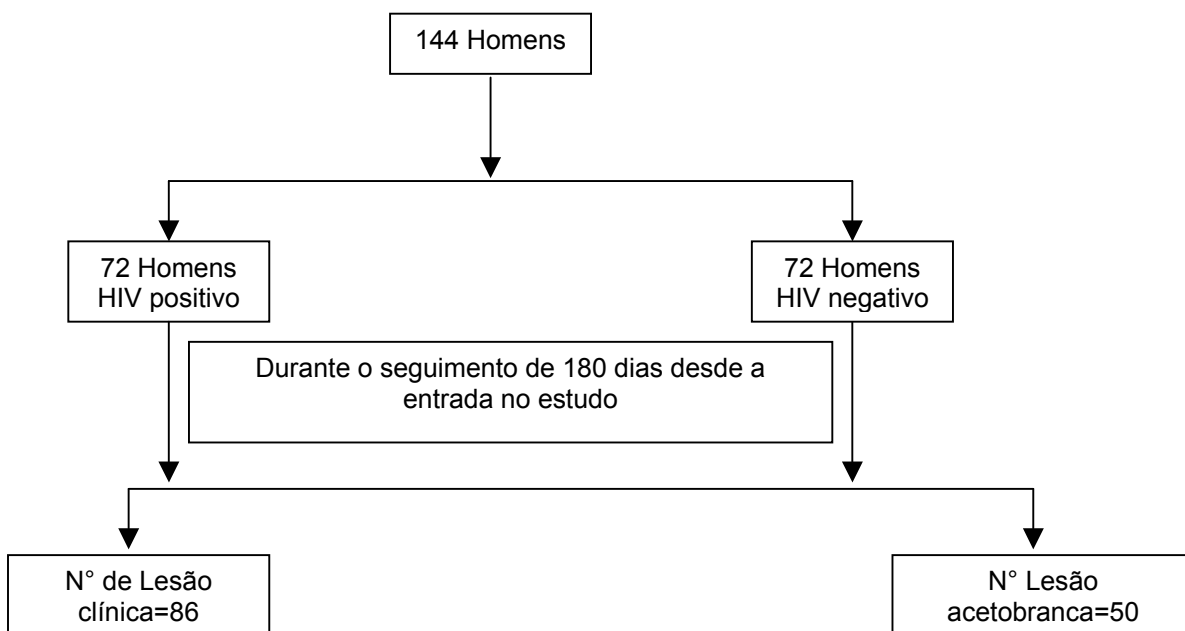
Tabela 11 - Distribuição do número e porcentagem das lesões clínica e acetobranca, de acordo com a histologia segundo a classificação do Departamento de Dermatologia.

Classificação	Lesão clínica n (%)	Lesão acetobranca n (%)	Total n (%)
Compatível	20 (29)	6 (10)	26 (20)
Sugestivo	31 (46)	13 (21)	44 (34)
Inflamatório	17 (25)	42 (69)	59 (46)
Total	68(100)	61 (100)	129 (100)

X^2 Pearson = 21,19 $P < 0,000$

5.4- AVALIAÇÃO DO DNA DE HPV NAS LESÕES CLÍNICA E SUBCLÍNICA DO PÊNIS

O fluxograma 2, abaixo, mostra os achados das lesões clínicas e acetobranças por meio da peniscopia durante o seguimento de 180 dias que foram retiradas para a realização da PCR de HPV. Não foi realizada histologia de 18 lesões clínicas e também não foi realizada a PCR de biópsias de 11 lesões acetobranças por motivos técnicos.



Nas 86 lesões clínicas relacionadas ao HPV que foram biopsiadas 85% (73/86) foram positivo para o DNA de HPV, sendo os tipos de HPV 6 e 11 os mais freqüentes encontrados nos dois grupos. Entretanto, o HPV 6 foi o mais comum no grupo HIV negativo e o HPV11 no grupo HIV positivo. **Tabela 12.**

Tabela 12 - Distribuição do número e percentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, dos tipos de HPV encontrados na biópsia de 86 lesões clínicas.

Tipo de HPV	HIV positivo n (%)	HIV negativo n (%)	Total n (%)
6	10 (23,3)	40 (63,0)	50 (46,7)
11	11 (25,6)	6 (9,4)	17 (15,9)
Negativo	6 (14,0)	7 (11,0)	13 (12,1)
51	3 (7,0)	2 (3,2)	5 (4,7)
42	1 (2,3)	2 (3,2)	3 (2,8)
58	1 (2,3)	1 (1,6)	2 (1,8)
66	1 (2,3)	1 (1,6)	2 (1,8)
16	2 (4,7)	-	2 (1,8)
18	1 (2,3)	1 (1,6)	2 (1,8)
33	2 (4,7)	-	2 (1,8)
52	-	2 (3,2)	2 (1,8)
55	1 (2,3)	1 (1,6)	2 (1,8)
40	1 (2,3)	1 (1,6)	2 (1,8)
59	1 (2,3)	-	1 (0,9)
84	1 (2,3)	-	1 (0,9)
PNI	1 (2,3)	-	1 (0,9)
Total n (%)	43 (100,0)	64 (100,0)	107 (100,0)

*Não foi realizada histologia de 18 lesões.

Oncogénicos: **cor vermelha**; Não -oncogénico: **cor azul**.

Não classificado: **cor preta**.

Entre 50 lesões acetobranças evidenciadas pela peniscopia, submetidas à biópsia, 30% (15/50) foram negativas ao DNA de HPV. Os tipos de HPV 6 e 16 predominaram nas biópsias, provenientes de lesões acetobranças, realizadas em ambos os grupos. Além disso, os HPV 6 e 16 foram os mais comuns encontrados no grupo HIV negativo e os tipos 6, 16, 33 e 59 no grupo HIV positivo. **Tabela 13.**

Tabela 13 - Distribuição do número e porcentagem dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, dos tipos de HPV encontrados na biópsia das 50 **lesões acetobranças**.

Tipos de HPV	HIV positivo n (%)	HIV negativo n (%)	Total n (%)
6	6 (25,0)	11 (27,5)	17 (26,6)
Negativo	3 (12,5)	12 (30,0)	15 (23,4)
16	2 (8,3)	3 (7,5)	5 (7,8)
84	1 (4,2)	2 (5,0)	3 (4,7)
53	1 (4,2)	2 (5,0)	3 (4,7)
33	2 (8,3)	1 (2,5)	3 (4,7)
11	1 (4,2)	2 (5,0)	3 (4,7)
59	2 (8,3)	-	2 (3,1)
58	1 (4,2)	1 (2,5)	2 (3,1)
83	-	1 (2,5)	1 (1,5)
82	-	1 (2,5)	1 (1,5)
73	1 (4,2)	-	1 (1,5)
56	1 (4,2)	-	1 (1,5)
55	1 (4,2)	-	1 (1,5)
54	1 (4,2)	-	1 (1,5)
52	-	1 (2,5)	1 (1,5)
51	-	1 (2,5)	1 (1,5)
35	1 (4,2)	-	1 (1,5)
26	-	1 (2,5)	1 (1,5)
18	-	1 (2,5)	1 (1,5)
Total n (%)	24 (100,0)	40 (100,00)	64 (100,0)

Não foi realizado a PCR de 11 biópsias. Oncogênicos: **cor vermelha
 Não-oncogênico: **cor azul**; Não classificado: **cor preta**.

A infecção simples, ou a detecção de um único tipo de HPV, encontrada na biópsia das lesões clínicas foi 83%(40/48), ou seja, maior no grupo HIV negativo em relação ao grupo HIV positivo que foi de 64%(16/25). O grupo HIV positivo apresentou maior número dos tipos de HPV oncogênicos, 12% (3/25) em relação ao grupo HIV negativo 6%(3/48). **Tabela 14.**

Tabela 14 - Distribuição do número e porcentagem dos tipos de HPV segundo número e oncogenicidade encontrados na biópsia de lesão clínica, nos homens soropositivos e soronegativos para o HIV.

Nº e tipos de HPV na lesão clínica	HIV positivo n (%)	HIV negativo n (%)	OR (IC 95%)	p
Múltiplo	9 (36)	8 (17)	2,81(0,81-9, 93).	
Unico	16 (64)	40 (83)	1	
Total	25 (100)	48 (100)	X ² =3,44	0,06
Oncogênico	3 (12)	3 (6)	2,8 (0,39-20,22)	
Não-oncogênico	15 (60)	42 (88)	1	
Ambos	5 (20)	3 (6)	X ² =5,12	0,07
Total	23 (100)*	48 (100)		

* Dois tipos de HPV não têm definição de oncogenicidade.

Na biópsia das lesões acetobranças dos homens soropositivos ao HIV foi encontrado 50% (7/14) de infecção múltipla de HPV em maior proporção em relação aos homens HIV negativos [42% (8/19), $p=0,7$]. O grupo HIV positivo apresentou 50% (7/14) dos tipos de HPV oncogênicos em relação ao grupo HIV negativo [26% (5/19), $p=0,41$]. As lesões clínicas e acetobranças não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os homens com sorologias positivas e negativas para HIV. **Tabela 15.**

Tabela 15 - Distribuição do número e porcentagem dos tipos de HPV segundo número e oncogenicidade encontrados na biópsia de **lesões acetobranças**, nos homens soropositivos e soronegativos para o HIV.

Nº e tipos de HPV na lesão acetobranca	HIV positivo n (%)	HIV negativo n (%)	OR (IC 95%)	p
Múltiplo	7 (50)	8 (42)	1,38 (0,28-6,95)	0,7
Único	7 (50)	11 (58)	1	
Total	14 (100)	19 (100)	$X^2=0,20$	
Oncogênico	7 (50)	5 (26)	1,96(0,26-13,88)	0,41
Não-oncogênico	5 (36)	7 (37)	1	0,33
Ambos	2 (14)	6 (32)	$X^2=2,2$	
Total	14 (100)	18 (100)*		

*Um tipo de HPV sem definição de oncogenicidade não foi incluído no grupo HIV negativo.

As lesões clínicas apresentaram infecção única de HPV quando comparadas às lesões acetobranças ($p=0,003$). Os tipos de HPV não oncogênicos encontrados foram mais os freqüentes ($p<0,000$). **Tabela 16.**

Tabela 16 - Distribuição do número e porcentagem dos tipos de HPV segundo número e oncogenicidade encontrados na biópsia de lesão clínica e acetobrança.

Nº e tipos de HPV	Lesão clínica* n (%)	Lesão acetobrança** n(%)	OR (IC 95%)	p
Múltiplo	14 (19)	15 (45)		
Único	59 (81)	18 (55)	3,72 (1,37-10,20)	0,003
Total	73 (100)	33 (100)		
Oncogênico	6 (8)	12 (38)		
Não-oncogênico	57 (81)	12 (38)	9,5 (2,62-36,14)	0,000
Ambos	8 (11)	8 (24)		
Total	71 (100)	32 (100)		

*Dois tipos de HPV sem definição encontrados nas lesões clínicas não foram incluídos.

**Um tipo de HPV sem definição e encontrado nas lesões acetobranças não foi incluído.

6. DISCUSSÃO

Até o momento nenhum estudo tipo observacional de coorte na genitália masculina na população HIV positiva foi encontrado na literatura. Nosso estudo é o primeiro com essa finalidade de conhecer a incidência, persistência e eliminação do DNA de HPV em um grupo de homens brasileiros.

O nosso estudo mostrou que tanto os homens soropositivos quanto negativos para o HIV tiveram um comparecimento importante nas três primeiras visitas, por serem de intervalos menores (30 dias) e menor comparecimento na visita quatro em que o intervalo foi de 180 dias da primeira visita. Em comparação com o estudo de Wikström et al. 2000, a taxa de comparecimento de duas vezes foi de 26%; três vezes de 8%; quatro vezes de 0,8% e cinco vezes de 2,1%. De fato, em nosso estudo obtivemos maior taxa de comparecimento, mostrando que a forma de coleta do material biológico do pênis por meio da escovação foi aceita e tolerada sem causar grandes incômodos. Assim, essa população teve uma boa aderência em participar de pesquisa, provavelmente em decorrência de outros fatores tais como, a abordagem do pesquisador, a sensibilização do paciente e a importância de seu retorno.

Vários estudos recentes demonstram que a infecção pelo HPV está presente em altas proporções em homens heterossexuais HIV negativos com taxas que variam de 52 a 72% (Dunne et al., 2006; Silva em 2006; Giuliano et al., 2008). A grande maioria dessas infecções é transiente e a eliminação

ocorre rapidamente nos indivíduos imunocompetentes (Giuliano et al., 2008). Além de serem poucos trabalhos, ainda há a dificuldade metodológica em relação ao tempo de seguimento bem como a definição do que é a persistência e eliminação do DNA do HPV.

Van Doornum e colaboradores (1994) definiram a **regressão da infecção** como a não detecção do DNA de HPV específico no genital no período de 365 dias de acompanhamento após um resultado positivo ao teste de DNA de HPV específico em uma das visitas iniciais. A **persistência intermediária** da infecção foi definida como a detecção de DNA de HPV tipo específico em duas visitas consecutivas dentro de 365 dias de observação. A **persistência longa** da infecção foi caracterizada com a detecção do mesmo tipo de HPV na genitália em três ou mais visitas consecutivas no período de 365 dias sem apresentar entre as visitas resultados negativos para HPV. Aqueles participantes que apenas foram positivos na primeira ou na última visita foram considerados de **duração e infecção desconhecida**. A **infecção recorrente** foi definida como uma infecção com o mesmo tipo de HPV no genital em diferentes visitas na qual durante o intervalo de uma visita foi negativa e depois positivou com o mesmo tipo da anterior.

Outro artigo de Wikström et al. (2000), em estudo prospectivo em homens assintomáticos para lesões induzidas pelo HPV, no período de até 16 meses. Eles definiram como infecção **transiente**, pacientes com pelo menos uma visita de seguimento ter o teste negativo para HPV após a visita inicial ser positiva, isto é, teste de HPV negativo depois de um teste positivo. A

Persistência de infecção foi definida naqueles indivíduos que continuam com o mesmo tipo de HPV durante as visitas. A **Nova** infecção foi conceituada naqueles que foram positivos para um novo tipo de HPV. A infecção “**flutuante**” (*fluctuating infection*) quando o homem estava positivo na primeira visita, negativo na próxima visita e positivo na seguinte para o mesmo tipo de HPV.

O nosso trabalho observou que não houve diferença estatisticamente significativa nos dois grupos HIV positivos e negativos em relação à persistência, a eliminação, a aquisição e ausência do HPV, provavelmente devido ao fato de que quase a totalidade dos homens HIV negativos serem provenientes de parceiras com infecção pelo HPV (conforme definido em casuística e métodos). Esses homens foram encaminhados para avaliação de peniscopia para o CRT-DST/AIDS. Em estudo prévio do autor (Silva, 2006) a maioria destes homens HIV negativos referiam ser monogâmicos e heterossexuais o que reduziria o risco de terem adquirido HPV fora da relação com a parceira fixa. No nosso estudo, os homens apresentaram uma maior taxa de persistência, de acordo com os critérios aqui definidos, em comparação aos estudos (Kjaer et al., 2005; Lajous et al., 2005; Partridge et al., 2007), provavelmente devido aos participantes do nosso estudo serem de alto risco para aquisição e da alta sensibilidade do teste de HPV realizado.

No grupo HIV positivo, a imunodeficiência poderia ser um dos fatores que determinou o risco de que este grupo estivesse infectado pelo HPV. Entretanto, devemos destacar que os homens soropositivos para HIV, durante

o seguimento, apresentaram uma maior frequência de infecção por mais de um tipo de HPV, múltipla infecção, bem como, os tipos oncogênicos em maior número comparados com o grupo HIV negativo. Provavelmente se deva ao fato da dificuldade de eliminar os HPV pelo sistema imunológico e do comportamento sexual desse grupo. É sabido que a imunidade humoral às proteínas do capsídeo viral, disparada por vacinas profiláticas contra HPV, é eficiente para a proteção contra a infecção (Villa et al., 2006), enquanto a resposta da imunidade inata e adaptativa mediada por célula parece importante para uma eventual eliminação da infecção pelo HPV (Roden e Wu, 2003; Welters et al., 2003; Stanley et al., 2008). Confirmando-se o papel do sistema imune no controle da infecção viral, é esperado o aumento da incidência de lesões causadas pelo HPV e infecções recorrentes observado nas pacientes imunodeprimidas pelo HIV (Cuthill et al., 1995; Levi et al., 2002). Além disso, a infecção múltipla pelo HPV é um fator de risco para a persistência da infecção tanto em soropositivo ao HIV como soronegativo (Kjaer et al., 2005; Lajous et al., 2005; Partridge et al., 2007). Pelos mesmos aspectos imunológicos, poder-se-ia interpretar que os homens soropositivos deste estudo apresentaram uma baixa taxa de eliminação em relação aos homens HIV negativos. No entanto, mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela proteção e eliminação da infecção pelo HPV não são completamente estabelecidos (Frazer, 2009).

Estudos epidemiológicos relataram os oitos tipos de HPV mais comum em 14.500 casos de câncer do colo uterino em todo mundo, destacamos na

região da América central e Sul os seguintes tipos: 16, 18, 31, 45, 33, 58, 52 e 35. Na literatura, os cânceres de pênis contem mais freqüentemente os tipos 16, 18 e 45 (IARC, 2007). Em esfregaços, os resultados indicam uma diversidade de tipos (Giuliano et al., 2008). Interessante ressaltar que no nosso estudo os tipos oncogênicos mais freqüentes foram os tipos 16, 52, 33 e 18, no grupo HIV positivo. No grupo HIV negativo os mais freqüentes foram os tipos 51, 16, 53 e 52.

A maioria dos fatores de risco para a detecção do HPV nos homens está relacionada naqueles encontrados nas mulheres. Os mais importantes fatores preditores para a aquisição de qualquer tipo de HPV são número de parceiros sexuais na vida, idade jovem, e não ser circuncidado (Svare et al., 2002, Giuliano et al., 2009a). Um estudo de história natural de HPV em homens iniciado em 2005 (*HIM study*, Anna Giuliano, *Moffitt Cancer Center*, Tampa, FL, EUA, investigadora principal), com homens assintomáticos, HIV negativos, realizado no Brasil, México e Estados Unidos da América, observou em um período de seguimento de 40 meses, que a probabilidade de adquirir uma nova infecção pelo HPV, conforme detectada por PCR em esfregaços penianos, é semelhante àquela relatada nas mulheres e não varia com o País ou a idade dos participantes. No período de 12 meses a probabilidade de adquirir qualquer tipo de HPV é de 39% (IC 95% de 0,353-0,43) (Giuliano et al., 2009b). Outro trabalho realizado por Patridge et al. (2007), em homens heterossexuais, universitários, utilizando a PCR para a detecção do DNA do HPV, mostrou incidência cumulativa de 62,4% (IC 95% de 52,6-72,2) para

qualquer tipo de HPV no período de 24 meses. A alta incidência neste estudo pode ser devida, em parte, ao comportamento sexual, facilidade da coleta da amostra peniana ou aumento da sensibilidade do teste realizado e por estes homens eram mais jovens (18 a 20 anos de idade) comparados aos homens estudo HIM em que a faixa etária foi de 18 a 44 anos.

Em outro estudo em que foram avaliados prevalência, incidência e potenciais fatores de risco para a infecção de HPV entre homens e mulheres heterossexuais com múltiplos parceiros, em uma clínica de DST de maio de 1988 a janeiro de 1991, usando a PCR para 4 tipos de HPV (6/11, 16,18 e 33), 31% (15/48) dos homens foram positivos para DNA de HPV à entrada do estudo e 29% (14/48) durante o período de seguimento (Van Doornum et al., 1994). O tipo de HPV mais freqüente foi 18 (50%), seguido de 16 (33%) e o 6/11 (21%). A incidência da infecção pelo HPV foi de 33 novas infecções, resultando em 50,5% homens/ano (IC 95% de 29,7-71,2).

Alguns fatores associados à aquisição da infecção pelo HPV como alto nível sócio-econômico, intercurso anal com homem, mais de três parceiros e uso de preservativo sempre/ocasional foram relatados em dois estudos (Kjaer et al., 2005; Lajous et al., 2005). Também nesses estudos, os fatores associados à persistência da infecção logo no início do seguimento foram a infecção múltipla de HPV e a diminuição da persistência nos indivíduos circuncidados.

No nosso estudo, a persistência foi semelhante em ambos os homens soropositivos e soronegativos ao HIV, provavelmente, em decorrência de

serem de alto risco para a infecção pelo HPV. Isto porque, os homens soronegativos eram parceiros de mulheres portadoras de infecção e ou alterações citológicas do colo uterino induzidas pelo HPV. Já no caso dos homens soropositivos ao HIV, a presença de múltipla infecção pelo HPV poderia ser atribuída a imunossupressão. Conforme já apontado, nos indivíduos imunodeprimidos por diferentes causas existe a dificuldade do sistema imune de eliminar a infecção pelo HPV. Além disso, uma das características dos HPV é a capacidade de burlar o sistema imune. Há muitas evidências que explicam este mecanismo de evasão, dentre as quais podemos destacar o fato de não haver viremia e com isso a expressão das proteínas tardias do capsídeo viral são limitadas e controladas porque não há lise dos queratinócitos e conseqüentemente não há liberação das citocinas pró-inflamatórias. Mais ainda, é sabido que as proteínas E6 e E7 interferem na resposta inata levando a supressão da sinalização do interferon e regulação negativa de citocinas antivirais e, portanto, pobre ou nenhuma ativação das células apresentadoras de antígenos (APCs) (Scott et al., 2001; Tindle et al., 2002; Frazer, 2004; Hasan et al., 2007; Stanley et al., 2008).

A progressão da infecção do HIV para a aids e morte tem sido notavelmente desacelerada com a introdução de terapia anti-retroviral, e com isso aumento da taxa de sobrevivência dessa população. Contudo, mesmo após a era HAART, não houve declínio das doenças relacionadas ao HPV (Aynaud et al., 1998; Palefsky, 2007; Kreuter e Wieland, 2009).

As variáveis potencialmente relacionadas à infecção pelo HIV, quais sejam, carga viral plasmática do HIV, contagem de linfócito T CD4 e uso de HAART foram importantes na caracterização dos homens soropositivos ao HIV na busca de comparar a aquisição, a persistência, à eliminação e a não infecção pelo HPV. No entanto, entendemos que a melhor forma de análise dos nossos dados seria análise multivariada, o que foi impossível devido ao baixo número de casos e eventos nesse estudo. A simples análise exploratória revelou, no entanto, alguns resultados interessantes, que passamos a discutir. Em homens soropositivos, em uso de HAART, carga viral do HIV alta (> 1000 cópias) e número de linfócitos T CD4 baixo (<200 células) apresentaram maiores taxas de persistência e de aquisição, o que está de acordo com o Palefsky (2007). Além disso, naqueles homens soropositivos ao HIV que não estavam usando HAART, com carga viral do HIV baixa (<1000 cópias) e contagem de linfócito T CD4 alta (>200 células), apresentaram uma maior taxa de eliminação e de ausência de DNA de HPV. Estes dados se assemelham àqueles descritos em homens americanos HIV positivos que se relacionam com homens, aonde a eliminação de HPV no canal anal foi maior neste grupo (Chin-Hong e Palefsky, 2002 e 2005; Palefsky, 2007).

No nosso estudo não foi realizada a análise multivariada com outros fatores de risco para a aquisição, eliminação e a persistência devido ao número pequeno de participantes. Aguarda-se com muito interesse os resultados de estudos de coorte com milhares de indivíduos, como é o estudo HIM do qual participamos (Giuliano et al., 2008).

O diagnóstico histopatológico das lesões associadas ao HPV tem grande importância na prática médica. De fato, grande parte das condutas e seguimento terapêuticos, e de avaliação da evolução para neoplasia através da graduação das lesões no trato ano-genital, se baseia nessa avaliação. Interessante que no nosso estudo, os grupos HIV positivo e negativo não apresentaram diferenças nas características histológicas nas lesões clínicas e acetobranca. Esperava-se que o grupo HIV positivo apresentasse um padrão histológico mais agressivo ou com uma das características mais freqüente. O pequeno número de casos pode ter sido responsável por esta observação. Além disso, poderíamos especular que o curto tempo de seguimento e as características do grupo estudado também tenham influenciado nossos resultados. Os dois casos de displasia de alto grau encontrados no nosso estudo foram diagnosticados histologicamente a partir de dois condilomas, localizados ao exame clínico de homens soropositivos ao HIV. Ao analisar a correlação com detecção e tipo de HPV, em um deles o raspado peniano foi negativo ao HPV e no outro, o esfregaço peniano apresentou os tipos 6,11, 16 e 39. Na biópsia da verruga deste paciente que apresentou múltiplos tipos de HPV foram encontrados os HPVs 11 e 16, apenas. No outro caso, o tipo encontrado na biópsia foi o HPV 6 (dados não mostrados). Isto sugere, conforme já apontado na literatura, que a infecção pelo HPV é multifocal (Hillman et al., 1993; Van Doornum et al., 1994; Bleeker et al., 2002; Partridge et al., 2007). Além disso, corrobora os achados de mais de um tipo de HPV em lesões de indivíduos imunocomprometidos conforme os trabalhos de Brown et

al. (1994) e Aynaud et al. (1998). A presença de múltiplos tipos de HPV em uma grande porcentagem de lesões de condiloma acuminado sugere que muitos indivíduos adquiriram outros tipos de HPV no momento da infecção por HPV tipos 6 ou 11 (Brown et al., 1999; Hippeläinen et al., 1994). Dependendo do tipo de teste de biologia molecular para a detecção do HPV a frequência de mais de um tipo de HPV nas verrugas podem variar de 2,4 % a 32% (Wickenden et al., 1988; Nuovo et al., 1991; Langenberg et al., 1993; Brown et al., 1994). Entretanto, mais estudos serão necessários para melhor entendimento da influência dos múltiplos tipos de HPV sobre a história natural da infecção bem como a consistência e relevância destes tipos, inclusive visando à prevenção primária dos tumores encontrados na genitália masculina.

Os tipos oncogênicos em quantidades muito baixa com os tipos não-oncogênicos podem ser mantidos nas lesões condilomatosas nos indivíduos assintomáticos, mas poderá iniciar a replicação viral se a imunossupressão ocorrer (Brown et al., 1999). A reativação da infecção latente parece ser o mecanismo provável para a detecção do HPV de alto risco e com os de baixo risco nas lesões verrucosas (Brown et al., 1999). Também, é possível que alguns pacientes possuam um número elevado de parceiros sexuais e são expostos a múltiplas infecções durante suas vidas (Van Doornum et al., 1994), como foi mostrado no nosso estudo. Outra possibilidade é que os tipos de baixo risco são mais difíceis do sistema imune celular do epitélio genital de controlar do que os tipos de alto risco, conforme discutido por Brown e colaboradores (1999). Esta hipótese poderia explicar a observação de que os

tipos de baixo risco foram mais freqüentemente encontrados em quase todos os condilomas acuminados, enquanto os tipos de HPV de alto risco foram detectados com mais freqüência em pacientes imunossuprimidos (Brown et al., 1999), semelhante ao encontrado em nosso estudo.

Em diversos estudos, a coilocitose é uma das características cito e histológicas definidoras e até patognomônica das lesões induzidas pelo HPV (Meisels et al., 1977; Krebs e Schneider, 1987; Oriel, 1990; Hippeläinen et al., 1993; Bleeker et al., 2002; Nicolau et al., 2005; Krawczyk et al., 2008) e que também foi encontrada no nosso estudo. Além da coilocitose, outra característica histológica importante e significativa encontrada nas lesões clínicas no nosso estudo foi a papilomatose, quando comparada às lesões acetobranças.

Na nossa observação, o critério de lesões acetobranças não se correlacionou com a detecção de lesões relacionadas ao HPV nessa população estudada. Isto indicaria que este critério é muito pouco específico, detectando uma série de alterações que não são associadas ao HPV. A detecção de lesões subclínicas aumentou consideravelmente a partir dos anos 80, quando se passou a utilizar a peniscopia como método diagnóstico, semelhante a colposcopia, para auxiliar o diagnóstico do HPV em homens (Baggish, 1982; Levine et al., 1984). Atualmente vários estudos questionam a utilidade da realização da peniscopia, para o diagnóstico de lesões subclínicas de HPV, por vários motivos. A peniscopia é um método que tem elevado índice de resultados falso-positivos em decorrência de processos inflamatórios

inespecíficos, infecciosos, traumas pós-coito ou de coleta de material citológico (Schultz et al.1988; Griffiths et al.1991; Trofatter Jr, 1997). Também não tem sido confirmada a relação entre a presença de lesões subclínicas, por exame citológico, histológico e a verificação da presença do DNA do vírus, por técnicas de biologia molecular (Mazzatenta et al., 1993; Strand et al.,1998; Nicolau et al., 2005; Silva, 2006; Frega et al., 2006).

O nosso estudo apresenta limitações como: número pequeno de sujeitos, pouco tempo de seguimento, não permitindo comparações com a população geral. Apesar disso, apresenta informações muito relevantes que estimulam a realização de mais estudos nessa população para melhor entendimento da infecção do HPV. Espera-se que estas informações possam contribuir para diminuir as taxas de morbidade e mortalidade das doenças causadas por HPV em homens, bem como a transmissão do vírus e até a implementação de medidas profiláticas por meio de vacinas. Finalmente, este conhecimento acumulado poderá levar ao desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas que venham a beneficiar estes grupos de indivíduos.

7. CONCLUSÕES

Não houve diferença nas frequências de persistência, aquisição e a eliminação de DNA de HPV no pênis de homens soropositivos e soronegativos para o HIV (parceiros de mulher portadora de infecção ou de lesão associada ao HPV).

Homens HIV positivos apresentaram uma maior frequência de infecção múltipla de HPV, sendo mais frequentes os oncogênicos. Os tipos de HPV 16, 6 e 84 foram os mais prevalentes.

Homens HIV negativos apresentaram predominantemente tipos de HPV não oncogênicos, incluindo em maior número os tipos de HPV 6, 51 e 84.

As lesões clínicas e subclínicas (acetobranças) localizadas tanto em HIV positivos quanto negativos apresentaram as mesmas características histológicas. Coilocitose e papilomatose foram às características histológicas mais importantes e significativas encontradas nas lesões clínicas (verrugas ou condilomas). No entanto, a associação com HPV e alterações morfológicas compatíveis com tais infecções foi menos clara em relação às lesões acetobranças, possível indicação da baixa especificidade deste diagnóstico.

Os homens soropositivos e negativos ao HIV apresentaram apenas um tipo de HPV nas lesões clinicamente diagnosticadas, sendo mais frequentes os tipos 6 ou 11. Nas lesões acetobranças, ou não havia DNA de HPV, ou encontrou-se o HPV 6 .

Homens soropositivos ao HIV que estavam usando HAART, com carga viral do HIV alta e contagem de células T CD4 baixa apresentaram maiores taxas de aquisição e persistência da infecção pelo HPV. Entretanto, homens soropositivos ao HIV que não estavam usando HAART, com carga viral do HIV baixa e contagem de células T CD4 alta apresentaram maiores taxas de eliminação e não ter a infecção pelo HPV.

8-ANEXOS

ANEXO – 1

1 - Extração do DNA total das amostras obtidas com escova e por biópsia

Preparo das Amostras

A) Biópsia: Os tubos contendo o fragmento em salina, foram centrifugados (Eppendorf, modelo 5415C, Alemanha) a 12.000 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado por aspiração a vácuo, e o restante estocado a -20°C até processamento.

B) Esfregaços: o material contido na escova foi, inicialmente, agitado vigorosamente, por aproximadamente, 60 segundos (Daiggee, modelo Genie 2, New York, EUA). Em seguida, com auxílio de uma pinça, a escova foi removida, e as células coletadas por centrifugação, a 12.000 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado, a vácuo, e o sedimento foi processado. A esse sedimento, foram adicionados 200µl de solução de digestão, contendo 50mM Tris-HCl pH 7,5, 1ml mM EDTA pH 8,0 e 0,5% Triton X-100, e 200µl de solução de proteinase K (TEP), seguindo-se incubação da amostra em banho-maria (Sheldon, modelo 1203 VWR, Alemanha), à temperatura de 50°C, por um período de 48h, agitando ocasionalmente, e dando uma breve centrifugada para que o material ficasse todo imerso em solução e não disperso na tampa ou parede do tubo. Adicionou-se mais 50µl de TEP, após 24 horas. Após o período completo da digestão, a enzima foi inativada por 15 minutos, a 96°C, no aparelho de banho seco (Heat block, Eppendorf, Thermostatplus). Foram adicionados 200µl de acetato de amônio 6M pH 8,5 e misturados no vórtex por 20 segundos, seguidos de centrifugação por 14.000 rpm, por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante que contém o DNA foi então, transferido para um novo tubo de 1,5ml, ao qual foram adicionados 600µl de Isopropanol frio. Foi misturado por inversão e incubado por uma noite, a -20°C ou, por 2 horas, a -70°C. Após esse período, os tubos foram colocados na centrífuga refrigerada de mesa (Eppendorf, 5804R C, Alemanha), a 12000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. Descartou-se o isopropanol, por inversão, e adicionaram-se 600µl de etanol 70% e misturados por inversão. Foi centrifugado, novamente, por 15 minutos, a 4°C a 12000 rpm e o etanol 70% foi descartado por aspiração, cuidadosamente. Repetiu-se mais uma vez o procedimento de lavagem, seguida de Inversão cuidadosa do etanol 70% e deixando-se o sedimento secando sobre papel absorvente. O material, contendo o DNA purificado, foi ressuspenso em 50µl de TE pH 7,5.

2- Amplificação do gene β -globina humana

Antes da PCR para amplificar o HPV DNA as amostras de DNA foram submetidas à reação de PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos GH20 (5'-

GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3') e PCO4 (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'), para amplificar um fragmento de 268 pb do gene β -globina humana. Esse procedimento garantiu a qualidade do DNA para a amplificação (pesquisa) do HPV (Saiki et al. 1988).

A PCR do gene β -globina humana foi realizada em volume de 25 μ L, contendo 0,2mM dos 4 desoxiribonucleotídeos (dNTPs), 2mM de MgCl₂, 80nM de cada iniciador(GH20/PCO4) e 0,5U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech, New Jersey, EUA) em tampão 1X (10mM Tris-HCl e 50mM KCl). Um controle negativo da reação contendo todos os componentes acima citados, exceto o DNA, foi incluído em todas as amplificações. Como controle positivo da reação utilizou-se DNA extraído das linhagens celulares provenientes de carcinomas de colo uterino positivas para HPV, *HeLa* (HPV18) ou *SiHa* (HPV16). As amplificações foram realizadas em termociclador (modelo Mastercycler gradiente-Eppendorf, Alemanha). As condições da PCR foram as seguintes: um passo inicial de 5 minutos a 95°C, para desnaturação, seguido de 40 ciclos de 1 minuto de desnaturação, a 95°C, 1 minuto a 55°C, e 1 minuto a 72°C, seguido de um último ciclo de 5 minutos a 72°C, para a extensão final e posterior manutenção, a 4°C.

O gel de poliacrilamida 8% com 0,75mm de espessura foi preparado com 7ml da solução de pré mix, que contém 26,6ml de acrilamida/bisacrilamida (metilenobisacrilamida) 29:1, 10ml de BTE (tampão Tris-Borato-EDTA (ácido tetraacético etilenodiamina) (Tris-borato 89mM e EDTA, pH 8,3 2mM) 10X concentrado em q.s.p para 100ml com água destilada e deionizada. Para a polimerização adicionaram-se 7 μ L de TEMED (tetrametiletilenodiamina) e 70 μ L de persulfato de amônio a 10%. Como marcador de peso molecular utilizou-se ϕ X174RF/*HaeIII*(0,5 μ g-40 μ g / μ L)16 μ L de FICOLL e 80 μ L de TE. Após a polimerização, foram aplicados em gel, cerca de 5 μ L dos produtos amplificados, acrescidos de 2 μ L de tampão de amostra (0,25% de Azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol e 15% de Ficoll em água). Em seguida, o gel foi submetido à eletroforese, na fonte de tensão (modelo 250EX, Life Technologies, EUA), com voltagem constante de 100V, por cerca de 40 minutos, utilizando-se como tampão de corrida, BTE 1X concentrado, pH 8,3.

O processo de coloração com nitrato de prata (Sanguinetti et al., 1994) consistiu de uma fixação inicial, sob agitação, por 15 minutos, em uma solução de 10% de etanol e 0,5% de ácido acético. Após esse tempo, adicionaram-se 20ml de nitrato de prata 0,2%, por 10 minutos, ainda sob agitação. Desprezou-se a solução, lavou-se o gel em água destilada e deionizada, cerca de duas vezes, para tirar o excesso do fixador. Revelou-se em 3,0% de NaOH e 0,1% de formaldeído em água destilada e deionizada, por, aproximadamente, 15 minutos, sob agitação. O gel foi fixado por mais 10 minutos e, finalmente, feita a secagem do gel entre duas folhas de papel celofane hidrofílico incolor, sobre uma placa de vidro. A visualização dos fragmentos correspondentes a 268pb do gene β -globina humana foi feita por observação direta das bandas no gel.

3- Amplificação do gene β -globina humana

As amostras negativas para a amplificação do gene da β -globina humana foram submetidas a uma nova amplificação, porém com o dobro do volume do DNA extraído da amostra. Independentemente dos resultados serem negativos as amostras foram submetidas a PCR para amplificar o gene L1 de quase todos os tipos de HPV, usando os iniciadores degenerados PGMY09/PGMY11.

4 - Amplificação do DNA do HPV

As amostras que foram positivas para a amplificação da β -globina foram amplificadas, empregando-se os oligonucleotídeos PGMY09 e PGMY11, (Gravitt et al. 2000), que amplificam uma região conservada de 450 pares de bases do gene L1, de vários tipos de HPV. Os iniciadores PGMY09/PGM11 são degenerados em algumas posições. Assim, o anelamento é possível a mais de um tipo de nucleotídeo, durante a reação da PCR e, desta maneira, a amplificação de um grande espectro de HPV genitais.

Para 100 μ L da reação, utilizaram-se as seguintes concentrações finais de cada reagente: 200 μ M de dNTPs, 4mM MgCl₂, 0,4 μ M dos iniciadores PGMY9/PGMY11, 0,04 μ M GH20/PCO4 e 5U/ μ L Ampli Taq Gold (Roche, New Jersey, EUA) em tampão 1X (Tris-HCl 10mM, pH8,4, KCl 50mM). O controle negativo de HPV da reação foi DNA da linhagem celular C33A (carcinoma de colo de útero HPV negativo). Os controles positivos usados foram: DNA de plasmídeo, contendo o genoma completo de HPV-16 e DNA da linhagem celular *HeLa*, que contém HPV-18 (Yee et al., 1985). Como controle negativo da reação, foi incluído um tubo com a mistura de reação, sem adicionar qualquer DNA.

Um ciclo inicial de 13 minutos, a 95°C, seguido de 40 ciclos, de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, e 1 minuto a 72°C. A seguir, um último passo de 5 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel, de agarose a 1% (1g de agarose para 100ml de BTE 1X: 5,5g de ácido bórico; 10,8g de Tris, 0,925g de EDTA em 1L de água destilada e deionizada). A eletroforese foi conduzida em tampão BTE 0,5X, a uma voltagem constante de 100V na fonte de tensão (modelo 250EX, Life Technologies, EUA). O marcador de peso molecular utilizado foi ϕ X174RF/*HaeIII*. O gel foi corado com brometo de etídio a 0,5%, para que as bandas de aproximadamente, 450 pb fossem, posteriormente, visualizadas sob luz ultravioleta (Transilluminator GUM-20, Uniscience Syngene, EUA) e fotografada com máquina Polaroid (FB-PDC-34, Fisher Biotech, Pittsburgh, EUA) utilizando o filme Polaroid 667-película instantânea em branco e preto.

5 - Tipagem do papilomavírus humano

A determinação dos tipos de HPV, presentes nas amostras clínicas, foi feita por hibridização em pontos (dot blot) e/ou análise de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) (Bernard et al., 1994).

6 - Hibridização em pontos (“DOT BLOT”)

Os produtos amplificados por PCR, com os iniciadores PGMY09 /PGMY11 e GH20/PCO4, foram submetidos ao procedimento de tipagem dos vírus, utilizando-se o método de hibridização em pontos.

A técnica utilizada baseou-se na descrição de Manos e colaboradores. (1989), com algumas modificações. Empregaram-se como sondas, oligonucleotídeos específicos para a região amplificada, marcados radioativamente com P^{32} , por uma reação com a T4 polinucleotídeo quinase. Um conjunto de cerca de 28 oligonucleotídeos tipo-específicos foi utilizado nas hibridizações, além de uma sonda genérica, que consiste de uma mistura de produtos de 4 PCR para HPV, dos tipos 16, 18, 31 e 51, que foi capaz de hibridizar com todos os tipos de HPV genitais (Bauer et al., 1993; Hildesheim et al., 1994; Manos et al., 1989). Submeteu-se à hibridização, tanto as amostras positivas, como negativas, por PCR, uma vez que é possível que amostras negativas se revelem positivas, apenas após a hibridização, já que estas últimas, seguidas de auto-radiografia, são mais sensíveis que a simples detecção de bandas no gel de agarose. Sondas específicas foram empregadas para os seguintes tipos de HPV: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 68, 73, 82, 83, 84 e PCO3 isoladas ou misturadas. Os produtos da PCR foram diluídos 10 vezes em uma solução desnaturante de NaOH 1,6N, EDTA 0,1M, e a mistura, pipetada sobre uma membrana de náilon Hybond- N^+ (Amersham, Inglaterra), ajustada a uma placa de acrílico (Hybri-dot Manifold, Life technologies, EUA), acoplada a um sistema de vácuo. A membrana foi marcada com um lápis especial previamente, removida e colocada sobre um papel de filtro, para secagem e identificação das posições das amostras. Em seguida, o DNA foi fixado, pela exposição das membranas à luz ultravioleta no aparelho (Cross-linker, Hoefer, UVC500, San Francisco, EUA), por 20 segundos. As membranas foram umedecidas em solução 2X SSC (0,3M citrato de sódio e 3M NaCl (20X) e submetidas à pré-hibridização, em cilindros de vidro, contendo a solução 6X SSC, 10x Denhardt's (0,5% de SDS e 100 μ g/ml de esperma de salmão desnaturado), e incubadas no forno de hibridização (Labnet, EUA), a 55°C, durante 3 horas. Após essa incubação, procedeu-se a hibridização, adicionando-se as sondas radioativas à mesma solução anterior, e incubadas, novamente, à mesma temperatura, por 12 a 24 horas. Após esse período, as membranas foram removidas do cilindro e lavadas com solução 2x SSC, 0,1% de SDS, à temperatura ambiente, por duas vezes, 15 minutos cada, seguidas de mais duas lavagens, a 56°C, por 30 minutos, com a mesma solução. No final, as membranas foram expostas a filmes de raios-X, por 18 a 36 horas, a -70°C, e, em seguida, feita a revelação. Juntamente com os controles positivos, para os diferentes tipos de HPV, provenientes da amplificação do plasmídeo, nos quais estão clonados os Genomas inteiros de diversos tipos de HPV e de casos clínicos com resultado prévio de HPV, controles negativos provenientes da PCR PGMY09/11 e GH20/PCO4, sem DNA, também foram adicionados. O filme foi avaliado, após a revelação, nas marcas especificadas para os sinais

obtidos das sondas, recebendo uma demarcação vertical, com letras de “A até H”, e uma horizontal, cuja numeração foi de “1 a 12”. As amostras que não produziram sinais no filme foram consideradas negativas. Perfil da PCR de HPV em gel de poliacrilamida.

As amostras positivas para HPV pela PCR, porém, negativas na hibridização em pontos, ou que possuíam resultado duvidoso, foram tipadas, baseadas em RFLP dos genomas de HPV e por hibridização reversa em tiras (Roche Molecular diagnostics, EUA).

7 - Tipagem dos produtos da PCR por RFLP

A RFLP foi realizada a partir do produto amplificado pelos iniciadores genéricos PGMY09/11, o que permitiu diferenciar 43 tipos de HPV, através do padrão de fragmentos gerados, após digestão com sete enzimas de restrição (Bernard et al., 1994). Para esta análise, a reação da PCR foi feita nas seguintes condições (10x tampão, dNTPs, MgCl₂): apenas com os iniciadores PGMY09/11, em um volume final de 100µl, conforme descrito anteriormente, sem o iniciador da globina humana. As diferentes enzimas de restrição utilizadas foram: *BamHI*, *Ddel*, *HaeIII*, *Hinfl*, *PstI*, *RsaI* e *Sau3AI*. Um tubo, contendo apenas o tampão da enzima e o produto da PCR foi utilizado como controle negativo de digestão. Os produtos de digestão foram analisados em géis de poliacrilamida 8%, corados com nitrato de prata (Sanguinetti et al., 1994) e comparados aos mapas de restrição, já caracterizados, dos diferentes tipos de HPV (Bernard et al., 1994). O marcador de peso molecular ØX174RF/*HaeIII* foi aplicado em cada gel.

8 - Tipagem por hibridização reversa “line blot”

8.1- PCR para amplificação das amostras a serem tipadas pelas tiras Roche

As amostras foram amplificadas com os iniciadores PGMY09/PGMY11 biotinilados, que amplificam um fragmento de 450pb da região L1 ORF de HPVs e BGH20/BPCO4, também biotinilados, que amplificam um fragmento de 268pb do gene da b-globina humana (Roche Molecular Diagnostics, Alameda, CA).

Para 50µl da reação, utilizou-se a seguinte quantidade final de cada reagente: 30,15µl de H₂O, 5,0µl de 10X buffer, 1,0 µl de dNTPs(10mM de: dATP, dCTP, dGTP; e 30mM de dUTP), 8,0 µL de MgCl₂, (25mM), 1,0µl de PGMY 09 50µM, 1,0 µl de PGMY 11 50 µM, 0,05 µl de BGH20 50 µM, 0,05 µl BPCO4 50 mM, 0,75 µl AmpliTaq Gold 5U/µl, 3,0 µl DNA. O processo envolveu um ciclo inicial, de 9 minutos, a 95°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 55°C, e 1 minuto a 72°C, e seguido de um último ciclo de 5 minutos a 72°C, para a extensão final e, em seguida, a 4°C.

Para analisar se o produto foi amplificado, 5ml do mesmo foi aplicado em gel de agarose 1%. As soluções de hibridização (4x SSPE em 0,5% de SDS) e de lavagem (1X SSPE em 0,1% de SDS) foram aquecidas, a 53°C. As

amostras foram desnaturadas, adicionando-se, em uma microplaca, 40ml da solução desnaturante e 40ml do produto amplificado. Logo após, foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos. As tiras, previamente identificadas, foram acondicionadas em cada canaleta, em uma bandeja apropriada, em que foram acrescentadas 3ml de solução de hibridização, a 53°C. Em seguida, 75ml do produto da PCR, já desnaturados, foram adicionados em cada canaleta, contendo as tiras, em que cada tira correspondeu a uma amostra. As tiras na bandeja foram incubadas em banho-maria, a 53°C, sob agitação por 40 minutos. Após esse tempo, a solução de hibridização foi removida, por aspiração a vácuo. À temperatura ambiente, 3ml da solução de lavagem foram adicionadas, sob agitação, e em seguida, desprezada a solução. Foram adicionadas 3ml da solução de lavagem e incubadas em banho-maria, a 53°C, sob agitação por 15 minutos. A solução de lavagem foi removida, por aspiração a vácuo. Em seguida, foram adicionados 3ml de conjugado (33µl streptavidina-peroxidase e 100ml solução de lavagem) e deixadas à temperatura ambiente, sob agitação por 30 minutos. O conjugado foi removido e lavado, rapidamente, com 3ml de solução de lavagem, à temperatura ambiente. A solução de lavagem foi removida e adicionada mais 3ml de solução de lavagem, deixando, sob agitação, por mais 10 minutos, em temperatura ambiente. Repetiu-se mais uma vez a lavagem, por 10 minutos. Adicionaram-se 3ml de citrato de sódio 1X concentrado e deixado, sob agitação, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, o citrato foi aspirado e adicionado 3ml da solução de revelação (150ml de citrato de sódio 0,1M, 7,5ml de 1X TMB (3,3',5,5'tetrametilbenzidina) e 15ml de H₂O₂ 30%), à temperatura ambiente, sob agitação por 10 minutos no mínimo. A bandeja foi coberta, para evitar que a solução reveladora entrasse em contato com a luz. Após esse tempo, as bandas tornaram-se visíveis. Foi aspirada a solução reveladora e lavada com água destilada para remover o excesso de revelador. Colocaram-se 3ml de citrato de sódio 1X concentrado, para cada tira. A identificação dos diferentes tipos de HPV foi feita, mediante a leitura das linhas azuis, que apareceram nas tiras, as quais foram comparadas com o padrão de tipos de HPV (linhas de referência), fornecido pelo fabricante.

ANEXO – 2**Tabela 1.** Distribuição dos casos, nos grupos HIV positivo e negativo, de acordo com as características sócio-demográficas. (modificado da Dissertação de Mestrado)

Características	n	%
IDADE		
Média (SD) 36,5 anos (18 a 66 anos)		
SOROLOGIA PARA HIV		
POSITIVO	72	50
NEGATIVO	72	50
RAÇA/COR		
Branco	77	53,5
Negro	8	5,6
Mulato	28	19,4
Amarelo	1	0,7
Outro	30	20,8
Escolaridade		
Nenhuma	1	0,7
1 ^a à 4 ^a série	20	13,9
5 ^a à 8 ^a série	36	25,0
2 ^o grau	64	44,4
Universitário	23	16,0
Estado civil		
Casado/morar junto	53	36,8
Separado/desquitado/divorciado/viúvo	9	6,3

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aboulafia DM, Gibbons R. Penile cancer and human papilloma virus (HPV) in a human immunodeficiency virus (HIV)-infected patient. *Cancer Invest.* 2001; 19 (3): 266-72.

Arany I, Tyring SK. Systemic immunosuppression by HIV infection influences HPV transcription and thus local immune responses in condyloma acuminatum. *Int J STD AIDS.* 1998; 9(5): 268-71.

Arends MJ, Wyllie AH, Bird CC. Papillomaviruses and human cancer. *Human pathol.* 1990;21: 686-98.

Aynaud O, Piron D, Barrasso R, Poveda JD. Comparison of clinical, histological, and virological symptoms of HPV in HIV-1 infected men and immunocompetent subjects. *Sex Transm Infect.* 1998; 74: 32-4.

Aynaud O, Ionesco M, Barrasso R. Penile intraepithelial neoplasia. Specific clinical features correlated with histologic and virologic findings. *Cancer.* 1994; 74:1762-7.

Baggish MS. Treating viral venereal infections with the CO2 laser. *J Reprod Med.* 1982; 27:737-42.

Baken LA, Koutsky LA, Kuypers J, Kosorok MR, Lee SK, Kiviat NB, Holmes KK. Genital human papillomavirus infection among male and female sex partners: prevalence and type-specific concordance. *J Infect Dis.* 1995; 171(2): 429-32.

Baldwin SB, Wallace DR, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Vaught LC, Kornegay JR, Hallum JA, Redmond SA, Giuliano AR. Human papillomavirus infection in men attending a sexually transmitted disease clinic. *J Infect Dis.* 2003; 187:1064-70.

Barrasso R, de Brux J, Croissant O, Orth G. High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med.* 1987; 317:916-23.

Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of papillomavirus infections. *J Clin Virol.* 2005; 32 Suppl 1:S16-24.

Bernard H, Chan S Y, Delius H. Evolution of papillomaviruses. *Curr Top Microbiol.* 1994a; 186: 33-54.

Bernard H, Chan S, Manos MM, Ong C, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CH. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polimerase chain reaction amplification, restriction fragment polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogeny algorithms. *J Infect Dis.* 1994b; 170:1077-85.

Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005; 32 (Suppl) 1:S1-6.

Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer.* 2001; 91: 2315-21.

Bibbo M & Moraes e Silva Filho A. Lesões Relacionadas à Infecção por HPV no Trato Anogenital. Livraria e Editora Revinter LTDA, Rio de Janeiro, 1998.

Bleeker MC, Hogewoning CJ, Van Den Brule AJ, Voorhorst FJ, Van Andel RE, Risse EK, Starink TM, Meijer CJ. Penile lesions and human papillomavirus in male sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Am Acad Dermatol.* 2002; 47(3): 351-7.

Bleeker MC, Hogewoning CJ, Berkhof J, Voorhorst FJ, Hesselink AT, van Diemen PM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ. Concordance of specific human papillomavirus types in sex partners is more prevalent than would be expected by chance and is associated with increase viral loads. *Clin infect Dis.* 2005;41:612-20.

Boletim Epidemiológico-Aids e DST. Ano V-nº1. Dezembro 2008. Ministério da Saúde-Secretaria de Vigilância em Saúde-Programa Nacional de DST/Aids.

Breese PL, Judson FN, Penley KA, Douglas JM Jr. Anal human papillomavirus infection among homosexual and bisexual men: prevalence of type-specific infection and association with human immunodeficiency virus. *Sex Transm Dis.* 1995; 22: 7-14.

Brown DR, Schroeder JM, Bryan JT, Stoler MH, Fife KH. Detection of multiple human papillomavirus types in Condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(10): 3316-22.

Brown DR, Bryan JT, Cramer H, Katz BP, Handy V and Fife KH. Detection of Multiple Human Papillomavirus Types in Condylomata Acuminata from immunosuppressed Patients. *J Infect Dis* 1994; 170: 759-65.

Braun L. Role of human immunodeficiency virus infection in the pathogenesis of human papillomavirus-associated cervical neoplasia. *Am J Pathol* 1993; 144:209.

Broker, T. R. Structure and genetic expression of papillomavirus. *Obstet Gynecol Clin. North Am.* 1987;14:329-47.

Brown, DR; Fife, KH. Human papillomavirus infections of the genital tract. *Med Clin North Am.* 1990; 74:1455-85.

Buechner SA. Common skin disorders of the penis. *BJU Int.* 2002; 90:498-506.

Campion MJ, Singer A, Clarkson PK, McCance DJ. Increased risk of cervical neoplasia in consorts of men with penile condylomata acuminata. *Lancet.* 1985; 27;1(8435):943-6.

Campion MJ, McCance DJ, Mitchell HS, Jenkins D, Singer A, Oriel JD. Subclinical penile human papillomavirus infection and dysplasia in consorts of women with cervical neoplasia. *Genitourin Med.* 1988;64(2):90-9.

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

Cason J, Kaye JN, Jewers RJ, Kambo PK, Bible JM, Kell B, Shergill B, Pakarian F, Raju KS, Best JM. Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. *J Med Virol.* 1995; 47:209-18.

Chan WK, Klock G, Bernard HU. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol.* 1989;63: 3261-9.

Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell.* 2000 (3):557-67.

Chen S, Slavin J, Fairley CK, Tabrizi SN, Borg AJ, Billson V, Garland SM. The absence of HPV DNA in genital specimens from infants. *Genitourin Med.* 1993 69(4):270-2. *Genitourin Med.* 1993; 69 (4):270-2.

Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT. Viral E1 and E2

proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 5799-803.

Chin-Hong PV, Palefsky JM. Human papillomavirus anogenital disease in HIV-infected individuals. *Dermatol Ther*. 2005; 18 (1): 67-76.

Chin-Hong PV, Palefsky JM. Natural history and clinical management of anal human papillomavirus disease in men and women infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 2002; 35 (9): 1127-34.

Chopra KF, Tyring SK. The impact of the human immunodeficiency virus on the human papillomavirus epidemic. *Arch Dermatol*. 1997; 133: 629-33.

Cuthill S, Maiman M, Fruchter RG, Lopatinsky I, Cheng CC. Complications after treatment of cervical intraepithelial neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus. *J Reprod Med*. 1995; 40 (12): 823-8.

Clarke P, Ebel C, Catotti DN, Stewart S. The psychosocial impact of human papillomavirus infection: implications for health care providers. *Int J STD AIDS*. 1996; 7 (3): 197-200.

Conaglen HM, Hughes R, Conaglen JV, Morgan J. A prospective study of the psychological impact on patients of first diagnosis of human papillomavirus. *Int J STD AIDS*. 2001; 12: 651-658.

Critchlow CW, Hawes SE, Kuypers JM, Goldbaum GM, Holmes KK, Surawicz CM, Kiviat NB. Effect of HIV infection on the natural history of anal human papillomavirus infection. *AIDS*. 1998; 12 (10): 1177-84.

Crook T, Tidy JA, Vousden KH. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell*. 1991; 67: 547-56.

Cubilla AL, Meijer CJ, Young RH. Morphological features of epithelial abnormalities and precancerous lesions of the penis. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 2000; (205): 215-9.

De Sanjosé S, Palefsky J. Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. *Virus Res*. 2002; 89 (2): 201-11.

De Villiers EM, Faluquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.

De Villiers EM. Taxonomic classification of human papillomaviruses. *Papillomavirus Report*, 2001; 12: 57-63.

Doorbar J, Campbell D, Grand RJ, Gallimore PH. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J*. 1986; 5: 355-62.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, Mclean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 1991; 352: 824-7.

Doorbar J, Gallimore PH. Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J Virol*. 1987;61:2793-99.

Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005 ; 32 Suppl 1:S7-15.

Dyrson N, Guida P, Münger K, Harlow E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 protein mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol*. 1992; 66: 6893-902.

Dyrson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989; 243:934-7.

Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE & Giuliano AR. Prevalence of HPV infection among Men: A Systematic Review of the Literature. *J Infect Dis* 2006; 194; 1044-57.

Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJB, Glina S. Epidemiologic Study on Penile Cancer in Brazil. *International Braz J Urol* 2008; 34(5):587-593.

Ferenczy A, Winkler B. Cervical intraepithelial neoplasia and condyloma in: Kurman RJ. *Blaustein's pathology of the female genital Tract*. 3rd ed. 1993, p.179-182.

Franceschi S, Castellsague X, Dal Maso L, Smith JS, Plummer M, Ngelangel C, Chichareon S, Eluf-Neto J, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ, Bosch FX, Munoz N. Prevalence and determinants of human papillomavirus genital infection in men. *Br J Cancer* 2002; 86:705-11

Frazer IH. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology*. 2009; 384 (2): 410-4.

Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(1): 46-54.

Frega A, French D, Pace S, Maranghi L, Palazzo A, Iacovelli R, Biamonti A, Moscarini M, Vecchione A. Prevalence of acetowhite areas in male partners of women affected by HPV and squamous intra-epithelial lesions (SIL) and their prognostic significance. A multicenter study. *Anticancer Res.* 2006; 26 (4B): 3171-4.

Gage JR, Sandhu AK, Nihira M, Bonecini-Almeida MG, Cristoforoni P, Kishimoto T, Montz FJ, Martinez-Maza O. Effects of human papillomavirus-associated cells on human immunodeficiency virus gene expression. *Obstet Gynecol.* 2000; 96:879-85.

Gallowy DA. Papillomavirus vaccines in clinical trials. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3:469-75.

Garzetti GG, Ciavatti A, Butini L, Vecchi A, Montroni M. Cervical dysplasia in HIV-seropositive women: role of human papillomavirus infection and immune status. *Gynecol Obstet Invest.* 1995; 40(1): 52-6.

Giuliano AR, Lazcano E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee JH, Papenfuss M, Abrahamsen M, Baggio ML, Silva R, Quiterio M. Circumcision and sexual behavior: factors independently associated with human papillomavirus detection among men in the HIM study. *Int J Cancer.* 2009a; 124 (6): 1251-7.

Giuliano AR, Lee JH, Fulp WJ, Villa LL, Lazcano-Ponce E, Papenfuss MR, Smith D, Abrahamsen. International HPV Incidence among Men ages 18-70 years. Poster Oral no The 25th International Papillomavirus Conference, Maio 8-14, Malmö, 2009b.

Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee J, Papenfuss MR, Abrahamsen, Jolles E, Nielson CM, Baggio ML, Silva R, Quiterio M. The Human Papillomavirus Infection in Men Study: Human Papillomavirus Prevalence and Type Distribution among Men Residing in Brazil, Mexico, and the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(8):2036-43.

Gomousa_michael M, Gialama E, Gomousa N, Gialama G. Genital human papillomavirus infection and associated penile intraepithelial neoplasia in males infected with the human immunodeficiency virus. *Acta Cytol* 2000; 44: 305-309.

Griffiths M, Penna LK, Tovey SJ. Aceto-white change of the glans penis associated with balanitis not human papillomavirus infection. *Int J STD AIDS* 1991; 2: 211-12.

Gross G, Von Krogh G, Barrasso R. Therapy - genitoanal lesions. In: Gross, G, Von Krogh G, editors. *Human papillomavirus infections in dermatovenereology.* Boca Raton: CRC-Press; (USA) 1997. p.389.

Gross G E. Infecção por papilomavírus humano: Atlas clínico de HPV/Gerd E. Gross e Renzo Barrasso; trad. Maria Alice Guimarães.Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda., 1999.p67,119 e150 .

Handsfield HH. Clinical presentation and natural course of anogenital warts. Am J Med. 1997;102: 16-20.

Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, Mansour M, Vincent I, Gissmann L, Iftner T, Sideri M, Stubenrauch F, Tommasino M. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16.J Immunol. 2007; 178(5): 3186-97.

Hernandez BY,Wilkens LR,Zhu X,Thompson P,McDuffie K,Shvetsov YB,Kamemoto LE,Killeen J,Ning L & Goodman MT.Transmission of Human Papillomavirus in Heterosexual Couples.Emerging Infectious Diseases 2008; 6.Vol.14, 888-94.

Hillman RJ, Ryait BK, Botcherby M, Walker MM and Taylor-Robinson D. Human papillomavirus DNA in the urogenital tracts of men with genital dermatoses: evidence for multifocal infection. Int J STD AIDS 1993; 3:147-54.

Hippeläinen MI, Hippeläinen M, Saarikoski S, Syrjänen K. Clinical course and prognostic factors of human papillomavirus infections in men. Sex Transm Dis. 1994; 21(5): 272-9.

Hippelainen M, Syrjanen S, Hippelainen M, Koskela H, Pulkkinen J, Saarikoski S, Syrjanen K. Prevalence and risk factors of genital human papillomavirus (HPV) infections in healthy males: a study on Finnish conscripts. Sex Transm Dis. 1993; 20:321-8.

Howley PM. Papillomavirinae and their replication.In: Fields B, Knipe DM, Howley PM. Fundamental Virology.2nd ed. New York: Raven Press; 1996, p.947-78.

IARC –International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomaviruses.Lyon, Human papillomavirus, 1995. Vol 64.

IARC –International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomaviruses.Lyon, Human papillomavirus, 2007. Vol 90

Kaye JN, Cason J, Pakarian FB, Jewers RJ, Kell B, Bible J, Raju KS, Best JM. Viral load as a determinant for transmission of human papillomavirus type 16 from mother to child. J Med Virol 1994; 44: 415-21.

Kaye JN, Starkey WG, Kell B, Biswas C, Raju KS, Best JM, Cason J. Human papillomavirus type 16 in infants: use of DNA sequence analyses to determine the source of infection. *J Gen Virol.* 1996 ;77: 1139-43.

Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science,* 1991; 252: 1708-11.

Kirby P, Corey L. Genital human papillomavirus infections. *Infect Dis Clin North Am.* 1987; 1:123-43

Koutsky LA, Galloway DA, Holmes KK. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev.* 1988; 10:122-63.

Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJC, Svare EI, Paull G, Walbomers JMM, Schiller JT, Bock JE, Sherman ME, Lowy DR; Meijer CLM. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomark. Prev* 2001 ;10:101-6.

Kjaer SK, Munk C, Winther JF, Jørgensen HO, Meijer CJ, van den Brule AJ. Acquisition and persistence of human papillomavirus infection in younger men: a prospective follow-up study among Danish soldiers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14 (6): 1528-33.

Krawczyk E, Suprynowicz FA, Liu X, Dai Y, Hartmann DP, Hanover J, Schlegel R. A Koilocytosis:Cooperative Interaction between the Human Papillomavirus E5 and E6 Oncoproteins. *Am J Pathol.* 2008; 173(3): 682-8.

Krebs HB, Schneider V. Human papillomavirus-associated lesions of the penis: colposcopy, cytology, and histology. *Obstet Gynecol.* 1987 ;70: 299-304.

Kreuter A, Wieland U. Human papillomavirus-associated diseases in HIV-infected men who have sex with men. *Curr Opin Infect Dis.* 2009 ;22(2):109-14. Review.

Kyo S, Inoue M, Koyama M, Fujita M, Tanizawa O, Hakura A. Detection of high-risk human papillomavirus in the cervix and semen of sex partners. *J Infect Dis.* 1994; 170: 682-5.

Komly CA, Breitburd F, Croissant O, Streeck RE. The L2 open reading frame of human papillomavirus type 1a encodes a minor structural protein carrying type specific antigen. *J. Virol.* 1986; 60: 813-816.

Lassus J, Happonen H, Rankia A. Carbon dioxide (CO₂)-laser therapy cures macroscopic lesions, but viral genome is not eradicated in men with therapy-resistant HPV infection. *Sex Transm Dis*. 1994; 21: 297-302.

Law CL, Qassim M, Thompson CH, Rose BR, Grace J, Morris BJ, Cossart YE. Factors associated with clinical and sub-clinical anal human papillomavirus infection in homosexual men. *Genitourin Med*. 1991; 67: 92-8.

Lajous M, Mueller N, Cruz-Valdéz A, Aguilar LV, Franceschi S, Hernández-Avila M, Lazcano-Ponce E. Determinants of prevalence, acquisition, and persistence of human papillomavirus in healthy Mexican military men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14(7): 1710-6.

Langenberg A, Cone R, McDougall J, Kiviat N, Corey L. Dual infection with human papillomavirus in a population with overt genital condylomas. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28:434-42.

Lauro C, Ammaturo FP, Quirino L, Rotondi M, Soriano A, Panariello S. Evaluation of partners of women with HPV infection. *Minerva Ginecol*. 2000; 52:503-7.

Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, et al. High prevalence of human papillomavirus infection in Mexican males. *Sex Transm Dis* 2001; 28: 277-80.

Lechner M S, Laimins La. Inhibition of p53 DNA by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol*. 1994; 68: 4262-73.

Levi JE, Kleter B, Quint WG, Fink MC, Canto CL, Matsubara R, Linhares I, Segurado A, Vanderborght b, Neto JE, Van Doorn LJ. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3341-45.

Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and división. *Cell*. 1997; 88: 323-31.

Levine RU, Crum CP, Herman E, Silvers D, Ferenczy A, Richart RM. Cervical papillomavirus infections and intraepithelial neoplasia: a study of male sexual partners. *Obstet Gynecol*. 1984; 64:19-20.

Levine RV, Crum CP, Herman E, Silvers D, Ferenczy A, Richart RM. Cervical papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia; a study of male sexual partners. *Obstet Gynecol*. 1992;79:328-37.

Levy JA. Human immunodeficiency Virus. In: *The retroviridae*, LEVY J.A, editor

New York:Plenum Press, 1995.p 1-98.

Lopes A, Bezerra A L, Pinto CA, Serrano SV, De Mell OC, Villa LL. p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *J Urol.*2002; 168: 81-6.

Lowy D, Kirnbauer R, Schiller J. Genital human papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:2436-40.

Lu B, Wu Y, Nielson CM, Flores R, Abrahamsen M, Papenfuss M, Harris RB, Giuliano AR. Factors associated with acquisition and clearance of human papillomavirus infection in a cohort of US men: a prospective study. *J Infect Dis.* 2009; 199 (3): 362-71.

Maden C, Sherman KJ, Beckmann AM, Hislop TG, Teh CZ, Ashley RL, Daling JR. History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer.*J Natl Cancer Inst.* 1993 ;85(1): 19-24.

Magnusson P, Lichtenstein P, Gyllensten U. Heritability of cervical tumours. *Int J Cancer.* 2000; 88: 698-701.

Mandal D, Haye KR, Ray TK, Goorney BP, Stanbridge CM, Corbitt G. Prevalence of occult human papillomavirus infection, determined by cytology and DNA hybridization, in heterosexual men attending a genitourinary medicine clinic. *Int J STD AIDS* 1991; 2: 351-5.

Marra C, Ogilvie G, Gastonguay L, Clley L, Taylor D & Marra F. Patients with Genital Warts have a decreased Quality of Life. *Sexually Transmitted Diseases.*2009; 36: 258-60.

Mazzatenta C, Andreassi L, Biagioli M, Ricci S, Ratti G. Detection and typing of genital papillomaviruses in men with a single polymerase chain reaction and type-specific DNA probes.*J Am Acad Dermatol.* 1993; 28 (5 Pt 1): 704-10.

Meijer CJLM, Snijders PJF, Brule A. Screening for cervical cancer: should we test for infection with high-risk HPV? *CMAJ.* 2000; 163: 535-8.

Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol.* 1977.21(3):379-90.

Modis Y, Trus LB e Harrison ST. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* 2002;21:4754-62

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348(6): 518-27.

Münger K, Werness B A, Dyson N, Phelps W C, Harlow E, Howley P M. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 1989;8:4099-4105.

Nicolau SM, Camargo CG, Stávale JN, Castelo A, Dôres GB, Lörincz A, de Lima GR. Human papillomavirus DNA detection in male sexual partners of women with genital human papillomavirus infection. *Urology.* 2005; 65 (2):251-5.

Nuovo GJ, Darfler MM, Impraim CC, Bromley SE. Occurrence of multiple types of human papillomavirus in genital tract lesions. *Am j Pathol* 1991; 138: 53-8.

Nuovo GI, Forde A, Macconnell P, Fahrenwal DR. In situ detection of PCR-amplified HIV-1 nucleic acids and tumor necrosis factor cDNA in cervical tissues. *Am J Pathol.* 1993; 143:40.

O'Connor M, Apt D, Bernard HU. DNA tumor virus: papiloma. *Encyclopedia of Cancer.* California: Academic Press, 1997. p.520-31.

Oriel JD. Genital human papillomavirus infection. In: Holmes KK, Per-Anders M, Sparling PF, Wiesner PJ, editors. *Sexually Transmitted Diseases.* 1st ed. New York: McGraw-Hill; 1990. p433-41.

Oriel JD. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis,* 1971, 47, 1-13.

Pakarian F, Kaye J, Cason J, Kell B, Jewers R, Derias NW, Raju KS, Best JM. Cancer associated human papillomaviruses: perinatal transmission and persistence. *Br J Obstet Gynaecol.* 1994; 101:514-7.

Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, Ahn DK, Greenspan JS. Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res.* 1991;51: 1014-9.

Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, Jay N, Berry JM, Darragh TM. High incidence of anal high-grade squamous intra-epithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men. *AIDS.* 1998; 12: 495-503.

Palefsky JM, Holly EA. Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003 (31): 41-6.

Palefsky J. Human papillomavirus infection in HIV-infected persons. *Top HIV Med.* 2007; 15(4):130-3. Review.

Partridge JM, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:21-31.

Partridge JM, Hughes JP, Feng Q, Winer RL, Weaver BA, Xi LF, Stern ME, Lee SK, O'Reilly SF, Hawes SE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection in men: incidence and risk factors in a cohort of university students. *J Infect Dis.* 2007 15; 196(8): 1128-36.

Parkin DM & Bray F. The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24S3,2006, S3/11-25.

Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2000. *Int J Cancer* 2006; 118 (12): 3030-44.

Pim D, Collins M, Banks L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 1992; 7: 27-32.

Pomrantz Rj, De La Monte Sm, Donogan Sp, Rota TR, Vogt MW, Craven DE, Hirsch MS. Human immunodeficiency virus (HIV) infection of the uterine cervix. *Ann Intern Med.* 1988; 108: 321.

Pow-Sang MR, Benavente V, Pow-Sang JE, Morante C, Meza L, Baker M, Pow-Sang JM. Cancer of the penis. *Cancer Control.* 2002; 9:305-14.

Reid R, Stanhope CR, Herschman BR, Crum CP, Agronow SJ. Genital warts and cervical cancer. IV. A colposcopic index for differentiating subclinical papillomaviral infection from cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol.* 1984; 149:815-23.

Richart RM, Wright TC Jr. Pathology of the cervix. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1991; 3: 561-7.

Roberts S, Ashmole I, Rookes S, Gallimore P. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1--E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol.* 1997; 71: 3554-62.

Rotola A, Costa S, Monini P, Vendra C, Guida G, Terzano P, Di Luca D, Martinelli G, Cassai E. Impact of sexual habits on the clinical evaluation of male HPV infection. *Eur J Epidemiol* .1994;1 0: 373-380.

Roden R, Wu TC. Preventative and therapeutic vaccines for cervical cancer. *Expert Rev Vaccines*. 2003; 2(4): 495-516.

Rombaldi RL, Serafini EP, Villa LL, Vanni AC, Baréa F, Frassini R, Xavier M & Paesi S. Infection with human papillomaviruses of sexual partners of women having cervical intraepithelial neoplasia. *Braz J Med Biol Res*.2006; 39(2) 177-87.

Rosemberg SK, Greenberg MD, Reid R. Sexually Transmitted papillomaviral infection in men. *Obstet Gynecol clin North Am* 1987; 14: 495-512.

Rezza G, Giuliani M, Branca M, Benedetto A, Migliore G, Garbuglia AR, D'Ubaldo C, Pezzotti P, Cappiello G, Pomponi Formiconi D, Suligoi B, Schiesari A, Ippolito G, Giacomini G. Determinants of squamous intraepithelial lesions (SIL) on Pap smear: the role of HPV infection and of HIV-1-induced immunosuppression. DIANAIDS Collaborative Study Group. *Eur J Epidemiol*. 1997; 13: 937-43.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993; 75: 495-505.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990; 63: 1129-36.

Schiffman M, Castle PE, Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Path Lab Med*, 127(2003) 930-34.

Schiller JT, Vass WC, Vousden KH, Lowy DR. The E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. *J Virol* 1986; 57: 1-6.

Schultz RE, Skelton HG. Value of acetic acid screening for flat genital condylomata in men. *J Urol* 1988; 140: 1431-4.

Scott M, Nakagawa M, Moscicki A-B. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001; 8(2): 209–220.

Shin HR, Franceschi S, Vaccarella S, Roh JW, Ju YH, Oh JK, Kong HJ, Rha SH, Jung SI, Kim JI, Jung KY, van Doorn LJ, Quint W. Prevalence and

determinants of genital infection with papillomavirus, in female and male university students in Busan, South Korea. *J Infect Dis.* 2004; 190: 468-76.

Siegel JF, Mellinger BC. Human papillomavirus in the male patient. *Urol Clin North Am.* 1992; 19:83-91.

Silva RJC. Prevalência da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em homens soropositivos para HIV e homens parceiros de mulheres com infecção pelo HPV [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.

Silverberg MJ, Ahdieh L, Munoz A, Anastos K, Burk RD, Cu-Uvin S, Duerr A, Greenblatt RM, Klein RS, Massad S, Minkoff H, Mudespach L, Palefsky J, Piessens E, Schuman P, Watts H, Shah KV, The impact of HIV infection and immunodeficiency on human papillomavirus type 6 or 11 infection and on genital warts. *Sex Transm Dis.* 2002; 29(8): 427-35.

Sirera G, Videla S, Piñol, Cañadas MP, Llatjos M, Ballesteros AL, Garcia-Cuyás F, Castellá E, Guerola R, Tural C, Rey-joly & Clotet B. High prevalence of human papillomavirus infection in the anus, penis and mouth in HIV-positive men. *AIDS.* 2006, 20: 1201-1203.

Sonnex C, Strauss S, Gray JJ. Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts. *Sex Transm Infect.* 1999; 75(5): 317-9

Sousa R, Dostatni N, Yaniv M. Control of papillomavirus gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 1990; 1032:19-37.

Stanley M. The immunology of genital human papilloma virus infection. *Eur J Dermatol.* 1998; 8 (7 Suppl): 8-1

Stanley M, Gissmann L, Nardelli-Haefliger D. Immunobiology of human papillomavirus infection and vaccination - implications for second generation vaccines. *Vaccine.* 2008; 26 Suppl 10: K62-7.

Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Brevier J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature.* 1998; 393: 229-34.

Strauss S, Sastry P, Sonnex C, Edwards S, Gray J. Contamination of environmental surfaces by genital human papillomaviruses. *Sex Transm Infect.* 2002; 78(2): 135-8.

Strand A, Rylander E. Human papillomavirus. Subclinical and atypical manifestations. *Dermatol Clin*. 1998; 16: 817-22.

Sun XW, Kuhn L, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Wright TC Jr. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med*. 1997; 337: 1343-9.

Svare EI, Kjaer SK, Nonnenmacher B, Worm AM, Moi H, Christensen RB, van den Brule AJ, Walboomers JM, Meijer CJ, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. Seroreactivity to human papillomavirus type 16 virus-like particles is lower in high-risk men than in high-risk women. *J Infect Dis*. 1997; 176: 876-83.

Svare EI, Kjaer SK, Worm AM, Osterlind A, Meijer CJLM, van den Brule AJC. Risk factors for genital HPV DNA in men resemble those found in women: a study of male attendees at a Danish STD clinic. *Sex Transm Infect* 2002; 78:215-8.

Tommasino M, Adamczewski JP, Carlotti F, Barth C F, Manetti R, Contorni M, Cavalieri F, Hunt T, Crawford L. HPV-16 E7 protein associates with the protein kinase p53CDK2 and cyclin A. *Oncogene*. 1993; 8:195-202.

Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2 (1):59-65.

Tobian AAR, Serwadda D, Quinn TC, Kigozi G, Gravitt PE, Laeyendecker O, Charvat B, Ssempijja V, Riedesel M, Oliver AE, Nowak RG, Moulton L, Chen MZ, Reynolds SJ, Wawer MJ & Gray RH. Male Circumcision for the Prevention of HSH-2 and HPV Infections and Syphilis. *N Engl J Med* 2009 360;13.1298-1309.

Trofatter KF Jr. Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. *Am. J. Med*. 1997; 102:21-7.

Tseng CJ, Liang CC, Soong YK, Pao CC. Perinatal transmission of human papillomavirus in infants: relationship between infection rate and mode of delivery. *Obstet Gynecol*. 1998; 91:92-6.

Van Doornum GJJ, Prins M, Juffermans LHJ, Hooykaas C, Van Den Hoek JAR, Coutinho RA, Quint WGV. Regional distribution and incidence of human papillomavirus infections among heterosexual men and women with multiple sexual partners: a prospective study. *Gentourin Med*. 1994:240-46.

Vermon S, Hart CE, Reeves W, Icenogle JP. The HIV-1 tat protein enhances E2-dependent human papillomavirus transcription. *Virus Res*. 1993; 27: 133.

Villa LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res.*1997; 71:321-341.

Villa LL, Ault KA, Giuliano AR, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Brown DR, Ferenczy A, Harper DM, Koutsky LA, Kurman RJ, Lehtinen M, Malm C, Olsson SE, Ronnett BM, Skjeldestad FE, Steinwall M, Stoler MH, Wheeler CM, Taddeo FJ, Yu J, Lupinacci L, Railkar R, Marchese R, Esser MT, Bryan J, Jansen KU, Sings HL, Tamms GM, Saah AJ, Barr E. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine.*2006; 24(27-28): 5571-83.

Zara, F, Nappi, R, Berra, R, Migliavacca, R, Maserati, R, Spinillo, A Markers of local immunity in cervico-vaginal secretions of HIV infected women: implications for HIV shedding. *Sex Transm Infect.* 2004; 80(2): 108–112

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

Zür Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancer. *Biochem Biophys Acta.* 1996; 1288: F55-F78.

Zür Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(9): 690-8. Review.

Ward K, Winter PC, Walsh M, Maw RD, Dinsmore WW. Detection of human papillomavirus by the polymerase chain reaction in histologically normal penile skin adjacent to penile warts. *Sex Transm Dis.* 1994; 21:83-8.

Weaver BA, Feng Q, Holmes KK, Kiviat N, Lee SK, Meyer C, Stern M, Koutsky LA Evaluation of genital sites and sampling techniques for detection of human papillomavirus DNA in men. *J Infect Dis.* 2004; 15; 189:677-85.

Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ, van der Hulst JM, Kwappenberg KM, Hassane S, Franken KL, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Kenter G, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res.*2003; 63(3): 636-41

Werness BA, Levine Aj, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 1990; 248: 76-9.

Wideroff L, Schiffman MH, Hoover R, Tarone RE, Nonnenmacher B, Hubbert N, Kirnbauer R, Greer CE, Lorincz AT, Manos MM, Glass AG, Scott DR,

Sherman ME, Buckland J, Lowy D, Schiller J. Epidemiologic determinants of seroreactivity to human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in cervical HPV-16 DNA-positive and-negative women. *J Infect Dis.* 1996; 174:937-43.

Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, Koutsky LA. Condom Use and the Risk of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. 2006. *N Eng J Med* 354;25;2645-54.

Wikström A, Popescu C, Forslund O. Asymptomatic penile HPV infection: a prospective study. *Int J STD AIDS.* 2000; 1(2): 80-4.

Wikström A, Hedblad MA, Johansson B, Kalantari M, Syrjänen S, Lindberg M, Von Krogh G. The acetic acid test in evaluation of subclinical genital papillomavirus infection: a comparative study on penoscopy, histopathology, virology and scanning electron microscopy findings. *Genitourin Med.* 1992 ;(68): 90-92.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)