

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

GIVANILDO CARNEIRO BENICIO

LESÃO INTRA-EPITELIAL, DNA-HPV ANAL E FATORES DE RISCO
ASSOCIADOS EM MULHERES COM LESÃO INTRA-EPITELIAL GENITAL HPV
INDUZIDA

FORTALEZA – CE

2013

GIVANILDO CARNEIRO BENICIO

LESÃO INTRA-EPITELIAL, DNA-HPV ANAL E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS
EM MULHERES COM LESÃO INTRA-EPITELIAL GENITAL HPV INDUZIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de mestre em Patologia. Área de Concentração: Patologia Tropical.
Orientador: Prof. Dr. José Eleutério Júnior.

FORTALEZA – CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- B4151 Benicio, Givanildo Carneiro.
Lesão intra-epitelial, DNA-HPV anal e fatores de risco associados em mulheres com lesão intra-epitelial genital HPV induzida / Givanildo Carneiro Benicio . -- 2013.
63 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Patologia Tropical.
Orientação: Prof. Dr. José Eleutério Júnior.
1. Papillomavirus Humano. 31. 2. Saúde da Mulher. 3. Biologia Celular. 4. Fatores de Risco. I. Título.

GIVANILDO CARNEIRO BENICIO

LESÃO INTRA-EPITELIAL E DNA-HPV ANAL E FATORES DE RISCO
ASSOCIADOS EM MULHERES COM LESÃO INTRA-EPITELIAL GENITAL HPV
INDUZIDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFC como requisito à obtenção do título de mestre em Patologia. Área de Concentração: Patologia Tropical.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Eleutério Junior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Raquel Autran Coelho Peixoto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Ana Katherine Silveira Gonçalves de Oliveira
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Dedico este trabalho...

À Deus, minha fonte de vida e sustentáculo;

A minha família. Meus sinceros agradecimentos serão sempre pequenos diante de tudo que me foi proporcionado.

Ao meu orientador, Dr. Eleutério – ícone internacional no estudo do HPV, pela presença constante, ensinamentos e inspiração para a pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fonte de vida e luz que me guiou para conclusão desta nova fase em minha vida.

Aos meus pais Francisco e Evanilda, por me incentivarem e, por sempre ao meu lado estarem presentes e, com zelo apoiaram-se durante a caminhada.

Aos meus irmãos, por estarem ao meu lado em todos os momentos, ajudando-me a superar todos os obstáculos.

A família Silva (Sr. Francisco Allan, Sra. Vera, Allane Samara, Sra. Neurismar [LOURA], Allan Filho e Sr. Mario), minha segunda família, eles que me apoiam e que me “adotaram” como filho, devo muito a vocês.

Ao Prof. Dr. José Eleutério Júnior, por sua acessibilidade, orientação e dedicação que possibilitou o término desta pós-graduação.

À Dra. Denise Oliveira, este trabalho também é seu. Sempre atenciosa, disponível e presente em todas as etapas deste estudo. Você será sempre lembrada.

A todos os professores do Departamento de Patologia pelos ensinamentos dispensados nas aulas, que tanto contribuíram para a conclusão deste trabalho.

À Paula Palácio e a Milla, secretárias do Mestrado em Patologia, por sua dedicação e atenção com que sempre me atenderam.

Aos amigos do curso, pelo apoio constante, em especial minha amiga Rosiane Teles, e por tantos bons momentos compartilhados e ensinamentos.

À equipe de enfermagem da Maternidade Escola, pela ajuda constante na execução deste trabalho.

Ao Eugenio e Bruno, acadêmicos de Medicina, pela colaboração e participação ativa no desenvolvimento deste estudo.

À Diane Isabelle Magno Cavalcante e Renata Miriam Nunes Eleutério, e a todos do LABPEC que realizaram os testes, pela disponibilidade, empenho e confiança nos resultados desta pesquisa.

Ao CNPq pelo reconhecimento da relevância do Estudo e financiamento.

Às pacientes que participaram deste estudo, por toda a confiança com a qual vocês me presentearam.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram com a execução e término deste trabalho.

“Se um dia tudo lhe parecer perdido, lembre-se de que você nasceu sem nada, e tudo o que conseguiu foi através de esforços, e os esforços nunca se perdem, somente dignificam as pessoas.”

Charles Chaplin.

“Não só isso, mas nos gloriamos até das tribulações. Pois sabemos que a tribulação produz a paciência, a paciência prova a fidelidade e a fidelidade, comprovada, produz esperança. E a esperança não engana.”

Romanos: 5, 3-5.

RESUMO

O câncer de ânus, que corresponde a 4% de todas as neoplasias malignas do trato digestivo baixo, tem sido associado ao HPV. O câncer do canal anal tem como predominância as mulheres (1,5 a 5 vezes). Foram objetivos do estudo: Avaliar a frequência de DNA-HPV de baixo e alto risco oncogênico, e de lesão intra-epitelial anal por citologia em meio líquido (SurePath BD) entre mulheres imunocompetentes com lesão intra-epitelial genital, bem como identificar os fatores de risco associados. Foi realizado um estudo prospectivo controlado de natureza quantitativa, exploratória e descritiva no ambulatório da Maternidade Escola Assis Chateaubriand da Universidade Federal do Ceará de agosto de 2011 a setembro de 2012. Foram incluídas 150 mulheres, submetidas à genitoscopia no Ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia (PTGIC), com história de lesões genitais HPV induzidas onde foram obtidas informações, por meio de um questionário padrão. As pacientes foram submetidas ao procedimento de coleta de citologia anal utilizando o kit de citologia em meio líquido SurePath da empresa BD com pesquisa de DNA HPV pelo método de Captura Híbrida de 2^o geração. Os dados foram analisados utilizando o software Graphpad Prism 6.0, aplicando o teste t de Student para as variáveis nominais e o teste exato de Fisher para as variáveis quantitativas. A idade variou de 17 a 68 anos ($33,8 \pm 14,28$) no grupo de estudo, incluindo mulheres com lesão intra-epitelial genital e de 19 a 75 anos ($40,48 \pm 15,1$) no grupo controle com mulheres sem lesão genital. A prática do coito anal ocorreu em 44 (55%) das mulheres no grupo de estudo e por 34 (48,7%) no grupo controle. Analisando as atipias citológicas (ASC-US e LSIL), em 30% das mulheres com lesão genital por HPV mostraram presença de alteração em células do canal anal por citologia em meio líquido. As Lesões de Périneo e Perianus ($p= 0.0003$), Vulva ($p= 0.0157$) e Colo Uterino ($p=0.0223$) mostram-se associadas com as atipias citológicas anais no estudo. Não houve associação significativa entre DNA HPV e os grupos envolvidos na pesquisa, embora a tipificação do risco oncogênico apresentou-se com maior percentual nas mulheres com Lesão genital. Conclui-se que a atipia citológica anal mostrou-se freqüente entre mulheres com lesões perianais, vulvares e de colo uterino sugerindo a necessidade de rastreio de lesão intra-epitelial anal entre imunocompetentes.

Palavras-chaves: Papillomavirus Humano. Saúde da Mulher. Biologia Celular. Fatores de Risco.

ABSTRACT

The anal cancer, which corresponds to 4% of all malignant neoplasms of the lower digestive tract, has been associated with HPV. There is a predominance of anal cancer in women (1.5 out of 5 times). The objectives of the study were: to evaluate the frequency of low and high oncogenic risk DNA-HPV, and of anal intraepithelial atypia in liquid-based cytology (SurePath BD) among immunocompetent women with genital intraepithelial lesions, and to identify the related risk factors. A prospective controlled study of quantitative, exploratory and descriptive nature was conducted in the clinic of Maternidade Escola Assis Chateaubriand (Maternity School) of the Ceará Federal University from August 2011 to September 2012. One hundred and fifty women submitted to genitoscopy in the Clinic of Lower Genital Tract Pathology and Colposcopy (PTGIC) with a history of HPV-induced lesions were included in the study. A standard questionnaire was applied. The patients underwent the procedure of anal cytology collection using the kit of SurePath liquid-based cytology (BD®) and then the samples were sent to the cytopathology laboratory for cytology slides preparation and DNA-HPV detection through the 2nd generation Hybrid Capture method. The data were analyzed using GraphPad Prism 6.0 software, applying the Student t test for nominal variables and the Fisher exact test for quantitative variables. The age ranged from 17 to 68 years (mean = 33.8 ± 14.28) in the study group including women with genital intraepithelial lesions and from 19 to 75 years (mean = 40.48 ± 15.1) in the control group with women with no genital lesion. The practice of anal intercourse occurred in 44 (55%) women in the study group and 34 (48.7%) in the control group. Analyzing the cytological atypia (ASC-US and LSIL), 30% of women with genital HPV lesions showed the presence of changes in cells of the anal canal. Lesions of perineum and perianus ($p = 0.0003$), vulva ($p = 0.0157$) and uterine cervix ($p = 0.0223$) were associated with anal cytological atypia. There was no significant association between DNA-HPV in the groups. It is concluded that the anal cytological atypia was frequent among women with perianal, vulva and uterine cervix lesions suggesting the need for screening anal intraepithelial lesions among immunocompetent individuals.

Keywords: HPV; Women; Cytology; Cell biology; Risk factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação histopatológicas provocadas pelas atipias provocadas pela infecção do HPV.....	21
Figura 2 – Procedimento para coleta de citologia do canal anal.....	28
Figura 3 – Vial de Surepath para fixação do material antes do processamento.....	28
Figura 4 – Exame de citologia em meio líquido (SurePath) de canal anal evidenciando Células escamosas negativas para malignidade sem atipias (400x).....	39
Figura 5 – Exame de citologia em meio líquido (SurePath) de canal anal evidenciando Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) (400x).....	39
Figura 6 – Exame de citologia em meio líquido (SurePath) de canal anal evidenciando Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) (100x).....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características sócio-comportamentais dos grupos de estudo (com lesão genital HPV associada) e controle (sem lesão genital HPV associada) em mulheres imunocompetentes, no período de agosto de 2011 a setembro de 2012. (n=150).....	32
Tabela 2 – Métodos de Contracepção usados pelos grupos de estudo (com lesão genital HPV associada) e controle (sem lesão genital HPV associada) em mulheres imunocompetentes, no período de agosto de 2011 a setembro de 2012. (n=150).....	32
Tabela 3 – Lesões genitais no grupo estudo (com lesão genital HPV associada) e controle (sem lesão genital HPV associada) em mulheres imunocompetentes, no período de agosto de 2011 a setembro de 2012. (n=150)...	33
Tabela 4 – Laudos de citologia intra-anal em meio líquido (SurePath) dos grupos de estudo (com lesão genital HPV associada) e controle (sem lesão genital HPV associada) em mulheres imunocompetentes, no período de agosto de 2011 a setembro de 2012. (n=150).....	34
Tabela 5 – Distribuição das características sócio-comportamentais relacionadas as atipias citológicas do canal anal pelo método de citologia em base líquida (SurePath). (n=150).....	35
Tabela 6 – Distribuição dos sítios de Lesões Intra-epiteliais genitais relacionadas as alterações citológicas do canal anal pelo método de citologia em base líquida SurePath. (n=80).....	36
Tabela 7 – Distribuição das características sócio-comportamentais relacionadas a positividade de HPV no teste de Captura Híbrida de 2 ^o geração hC2. (n=150).....	37
Tabela 8 – Relação entre os resultados da citologia anal em base líquida do canal anal e a presença de DNA HPV pelo método de hC2. (n=150).....	37
Tabela 9 – Prevalência de HPV de Baixo e Alto risco anal em mulheres imunocompetentes com e sem lesão genital HPV associada, no período de agosto de 2011 a setembro de 2012.....	38
Tabela 10 – Prevalência de HPV de Baixo e Alto risco associados aos resultados da citologia em base líquida do canal anal em mulheres imunocompetentes no período de agosto de 2011 a setembro de 2012.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	alto risco
AR	anal receptivo
ASCUS	atypical squamous cells of undetermined significance
ASIL	Lesão intraepitelial escamosa anal
BR	baixo risco
CCE	carcinoma de células escamosas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CML	Citologia em Meio Líquido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA HPV	Ácido desoxirribonucléico do Papiloma Vírus Humano
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
GSIL	lesão intraepitelial escamosa genital
hC2	Captura híbrida de 2ª geração
HPV	Papiloma vírus humano
HPV AR	Papiloma vírus humano de baixo risco
HPV BR	Papiloma vírus humano de alto risco
HPV BR/AR	Papiloma vírus humano de alto e baixo risco
HSIL	High Grade Intraepithelial Lesion
IARC	Internacional Agency for Research on Cancer
LSIL	Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau
LSIL	Low Grade Intraepithelial Lesion
MEAC	Maternidade Escola Assis Chateaubriand
NCI	Instituto Nacional do Câncer
NIA	Neoplasia intraepitelial anal
NIAa	Neoplasia Intra-epitelial anal de alto grau
NIAa	NIA de alto
NIAb	baixo grau de malignização
NIAb	Neoplasia Intra-epitelial anal de baixo grau
NML	Negativo para malignidade
PTGIC	Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia
RR	Risco Relativo
SIL	Squamous Intraepithelial Lesion
TBS	The Bethesda System
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Papilomavírus humano.....	13
1.1.1	<i>Patogênese e papel oncogênico do HPV.....</i>	13
1.1.2	<i>História natural do Papiloma Vírus Humano.....</i>	15
1.1.3	<i>Epidemiologia da infecção do HPV.....</i>	16
1.1.4	<i>Carcinoma anal e HPV.....</i>	17
1.1.5	<i>Rastreamento do carcinoma anal e seus precursores.....</i>	18
1.1.6	<i>Alterações citológicas e histológicas manifestadas pelo HPV.....</i>	19
1.2	Métodos de detecção de lesões HPV associadas.....	21
1.2.1	<i>Citologia.....</i>	21
1.2.1.1	<i>Convencional.....</i>	21
1.2.1.2	<i>Meio líquido.....</i>	22
1.2.2	<i>Métodos biomoleculares.....</i>	22
1.2.2.1	<i>Captura híbrida de segunda geração.....</i>	22
2	JUSTIFICATIVA.....	24
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	Geral.....	25
3.2	Específicos.....	25
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1	Considerações éticas.....	26
4.2	Casuística.....	26
4.2.1	<i>Amostras.....</i>	26
4.3	Métodos.....	27
4.3.1	<i>Coleta das amostras.....</i>	27
4.3.2	<i>Citologia em meio líquido.....</i>	28
4.3.3	<i>Captura híbrida de 2ª geração (hC2).....</i>	29
4.4	Análise estatística.....	30
5	RESULTADOS.....	31
6	DISCUSSÃO.....	41
7	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	APÊNDICES.....	56
	ANEXOS.....	61

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) constituem um problema de saúde pública. Dentre as DST's se sobressai por sua alta frequência a infecção por papiloma vírus humano (HPV), (SAN JOSÉ; PALEFSKY, 2007), um Papovavírus composto por cerca 8000 pares de bases, cuja variação genômica permite a identificação de mais de 200 tipos virais, dos quais cerca de 50 são associados a lesões genitais e destes em torno de 14 identificados como de alto risco oncogênico (BORGES; SCHOR, 2005; GIRALDO *et al.*, 2008).

A associação do vírus com o câncer de colo uterino já está bem estabelecida. Anualmente, aproximadamente, 400.000 novos casos de câncer cervical são diagnosticados e mais de 200.000 mulheres morrem em consequência desta neoplasia (PARKIN *et al.*, 2005). Em média, 80% destes eventos ocorrem nos países em desenvolvimento (MUÑOZ *et al.*, 2003).

Após mais de 20 anos de investigação sobre a associação entre HPV e carcinoma cervical de células escamosas, restam poucas dúvidas a respeito do papel central do vírus na sua gênese. Sabe-se atualmente que aproximadamente 70% desses cânceres contêm HPV 16 e/ou 18 e que mais de 95% estão associados a um ou mais tipos virais de alto risco (KREIMER *et al.*, 2005).

As formas genitais mais comuns da infecção por HPV são as latentes (sem lesão visível mesmo com magnificação) e as subclínicas. Para as últimas é essencial o uso de métodos de magnificação como a genitoscopia (ELEUTÉRIO JR. *et al.*, 2004), enquanto para as primeiras métodos de biologia molecular são necessários (ELEUTÉRIO JR. *et al.*, 2007).

Os vírus de alto risco (HPV tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68) têm probabilidade maior de persistirem e estarem associados a lesões malignas. De fato, mais de 90% dos cânceres de colo de útero contêm DNA de HPV de alto risco. Em menor frequência carcinomas de ânus, vulva, vagina e pênis também tem DNA-HPV (NADAL; NADAL, 2008).

Além das neoplasias genitais o câncer de ânus, que corresponde a 4% de todas as neoplasias malignas do trato digestivo baixo, tem sido associado ao HPV (JACYNTHO *et al.*, 2011), as similaridades entre a história natural do HPV genital e da infecção anal tem sido estudada (GIRALDO; JACYNTHO *et al.*, 2009; JACYNTHO *et al.*, 2011).

O câncer anal é uma patologia rara na população geral, com incidência em torno de 0,8/100.000 habitantes. Essa incidência tem aumentado nas últimas décadas, ascendendo cerca de trinta vezes em pacientes adeptos do sexo anal receptivo (AR) (PALEFSKY *et al.*, 2005). Estudo recente tem demonstrado um aumento anual na ordem de 2% na incidência deste tumor (GUIMARÃES *et al.*, 2007). No Brasil, a incidência do câncer anal não é bem documentada visto que é publicada de forma conjunta com os tumores do cólon e reto, mais prevalentes (JACYNTHO, 2005).

1.1 Papilomavírus humano

Há mais de 200 papilomavírus reconhecidos, classificados em tipos, subtipos e variantes com base em homologia de DNA. Um novo genótipo é definido se possuir menos de 90% de homologia com a sequência nucleotídica de L1, E6 e E7, após o sequenciamento completo do genoma. Os subtipos são definidos quando apresentam entre 2 a 10% de divergência, enquanto as variantes apresentam menos de 2% (VILLA *et al.*, 2005).

Filogeneticamente os tipos que infectam a área genital pertencem ao gênero alfa e os associados com epidermodisplasia verruciforme cutânea, ao gênero beta. Os diferentes tipos têm tropismo por infectar diferentes tecidos, por exemplo, tipos epidérmicos (HPV 1-4, 10, 26-29, 37, 38, 46, 47, 49, 50, 57), e tipos genitais (HPV 6, 11, 16, 18, vários 30s, 40s, 50s, 60s, 70s) – (SMITH *et al.*, 2007).

Os tipos genitais de HPV podem ser classificados segundo o risco que conferem ao desenvolvimento de lesões neoplásicas do colo uterino em:

Tipos de baixo risco (BR): (HPVs 6, 11, 40, 42, 43 e 44), causadores de verrugas genitais externas (condiloma acuminado) e lesões benignas do colo uterino. Tipos de alto risco (AR): HPV tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68 encontrados em lesões de alto grau e carcinoma invasor (STOLLER, 2000; SMITH *et al.*, 2007).

1.1.1 Patogênese e papel oncogênico do HPV

Os papilomavírus humanos (HPV) são inoculados através de microtraumatismos ou soluções de continuidade nos epitélios pavimentosos da pele

ou mucosas do hospedeiro. Os vírions perdem o seu invólucro proteico e o genoma viral atinge o núcleo da célula basal, onde ele se estabelece de forma episomal (HAUSEN, 2006) – (Figura 02).

Este vírus é capaz de induzir lesões de pele ou mucosa, as quais mostram um crescimento limitado e frequentemente regridem espontaneamente. É infecção de transmissão na maioria das vezes por via sexual e extremamente comum. Com base em evidências têm-se sugerido que mais de 50% dos adultos sexualmente ativos tenham sido infectados por um ou mais tipos de HPV, sendo que cerca de 90% dessas infecções são transitórias (GIRALDO *et al.*, 2008; AMARAL *et al.*, 2009).

Em geral, a prevalência da infecção pelo HPV é variável, atingindo aproximadamente 20 - 30% das mulheres entre 20 e 24 anos de idade. A seguir, diminui para aproximadamente 3% a 10% das mulheres com mais de 30 anos de idade (HERRERO *et al.*, 2000; SELLORS; KARWALAJTYS; LYTWYM, 2003). Em torno de 80% das mulheres jovens que contraem o HPV, têm resolução espontânea em 12 a 18 meses (FRANCO *et al.*, 1995; LIAW *et al.*, 2000; THOMAS *et al.*, 2000).

Geralmente, o câncer se desenvolve à partir de várias alterações genéticas, que levam à ativação dos oncogenes ou à inativação dos genes supressores de tumor (CAMPOS *et al.*, 2005).

A proteína E6 dos HPV's genitais formam complexos com p53 (proteína de 53KDa). O gene 53 está localizado no cromossomo 17 e o produto do gene, a proteína p53, está envolvida nas vias de reparo ao dano do DNA, levando a uma interrupção do ciclo celular na fase G1 ou induzindo a apoptose. Por esta atividade de supressão do crescimento tumoral a p53 tem sido chamada de “guardiã do genoma”. A degradação e inativação de p53 resultam em aumento da instabilidade genética e em acúmulo das mutações oncogênicas (CAMPOS *et al.*, 2005).

Ainda, segundo Campos *et al.* (2005), a proteína E7 do HPV 16 forma complexos de alta afinidade com pRB (proteína do gene supressor do tumor retinoblastoma). O gene RB está localizado no cromossomo 13 e o produto do gene, a proteína pRB (105KDa) interage com o fator de transcrição celular E2F na fase G0 e G1 do ciclo celular. Tal interação inibe a transcrição induzida por E2F dos genes celulares ciclo-regulados, como a timidina cinase, c-myc, polimerase alfa, necessária para a entrada na fase S do ciclo celular.

A proteína viral E7 pode dissociar o complexo da pRB/E2F. A inativação da pRB e a liberação do fator de transcrição E2F que passa a ser ativo em todas as fases do ciclo celular, explica o encurtamento da fase G1 e o crescimento celular desordenado das células tumorais HPV-positivas (FOCCHI; BOVO; SILVA, 2000; CAMPOS *et al.*, 2005).

A instabilidade genética provocada por oncoproteínas virais e o aumento catalítico na expressão da oncoproteína provocada por mutações no genoma viral e celular identificam o vírus como importante força impulsionadora de progressão tumoral (FOCCHI; BOVO; SILVA, 2000).

1.1.2 História natural do Papiloma Vírus Humano

A infecção pode ser de uma das seguintes formas: uma infecção latente, em que não existe crescimento ou evidência microscópica da citopatia do vírus; uma infecção subclínica, em que a manifestação discreta que cuja visualização requer equipamento de magnificação (colposcópico); ou uma lesão clínica, visível a olho nu. Regressão espontânea pode ocorrer em qualquer uma dessas formas (BRENTJENS *et al.*, 2006).

O período de latência da infecção é extremamente variável, sugerindo que outros fatores, como comportamento sexual, status imunológico, predisposição genética, nutrição, tabagismo, nível socioeconômico, virulência e a concomitância com outras infecções sexualmente transmissíveis (*Chlamydia trachomatis*, *herpesvírus*), por exemplo, possam estar atuando (SCHEURER; TORTOLERO-LUANA; ADLER-STORTHZ, 2005).

Segundo Molano *et al.* (2002) na maioria das vezes, o vírus é eliminado em um período de aproximadamente 2 anos, sem deixar sequelas e muitas vezes sem manifestar qualquer sintoma.

A duração da infecção é mais longa para o HPV de alto risco oncogênico que para os de baixo risco e a persistência da infecção viral associa-se ao aumento do risco de aparecimento de lesões. Cerca de 1% da população infectada irá manifestar alguma lesão verrucosa e 4% terão alterações diagnosticadas à citologia (MOLANO *et al.*, 2002).

A maioria das doenças HPV relacionadas é atribuída aos HPV tipos 6, 11, 16 e 18. Os do tipo 6 e 11 são responsáveis por mais de 90% dos casos de verrugas

anogenitais em ambos os sexos e 25% das lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau. Os HPV tipos 16 e 18 estão associados a aproximadamente 25% dos casos de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, 50% das lesões intraepiteliais de alto grau, 70% dos casos de carcinoma epidermoide e 90% dos adenocarcinomas de colo uterino e, ainda, 70% dos outros carcinomas genitais na mulher e 90% dos casos de carcinoma anal (CARTER *et al.*, 2001).

Os homens, além de serem os transmissores mais frequentes da infecção para a mulher, são atingidos por cerca de 10.000 casos de carcinoma associados ao HPV (pênis, ânus, laringe, orofaringe e cavidade oral). Nos últimos anos tem-se observado um aumento importante dos casos de câncer anal, principalmente em homens que mantêm relações sexuais com homens. Um grupo considerado de altíssimo risco para esta doença é o dos HIV infectados (MUÑOZ; CASTELLSAGUE; GONZALEZ, 2006).

A taxa anual de carcinoma anal é de 35/100.000 homossexuais HIV-negativo e de 200/100.000 para o grupo HIV-positivo (MUÑOZ; CASTELLSAGUE; GONZALEZ, 2006), enquanto para mulheres imunocompetentes não há dados na literatura sobre a prevalência de carcinoma anal.

1.1.3 Epidemiologia da infecção do HPV

Estima-se que no mundo existam cerca de 450 milhões de novos casos de infecção viral por ano (PARKIM *et al.*, 2005).

Aproximadamente 5,5 milhões de novas transmissões pelo HPV ocorrem nos Estados Unidos a cada ano, representando cerca de um terço de todos os novos casos de doenças sexualmente transmissíveis (SCHEURER; TORTOLERO-LUANA; ADLER-STORTHZ, 2005).

As evidências indicam que mais de 70% dos parceiros de mulheres com infecção cervical por HPV e/ou neoplasia intra-epitelial são portadores desse vírus e estima-se que 20 milhões de homens e mulheres serão infectados pelo HPV em algum momento de suas vidas (XI *et al.*, 2013).

Parece haver uma associação entre outras doenças sexualmente transmissíveis e a infecção pelo HPV; infecção por herpes vírus, HIV, clamídia e sífilis podem estar relacionadas à progressão das lesões por HPV (CAVALCANTI *et al.*, 2000).

Nadal e Manzione (2006), versando sobre a epidemiologia do HPV anogenital, comentam que ainda faltam dados contundentes que possam definir a relação de “causa e efeito” entre o HPV e o câncer anal, mas, prudentemente, sugerem o controle das lesões clínicas e sub-clínicas provocada pelo HPV com o intuito de se evitar a eventual progressão do carcinoma invasivo.

Todavia, independente dos aspectos ainda não totalmente elucidados a respeito da causa, o que se observa é um aumento significativo da incidência do câncer anal. Baseado em dados epidemiológicos da década de 60, o câncer anal aumentou cerca de 3 vezes – mais nas mulheres que nos homens – numa taxa anual global estimada em 2,6% (MAGGARD; BEANES; KOCY, 2003).

Embora sua exata incidência populacional não seja tão bem conhecida como ocorre com câncer do intestino grosso, do pulmão e da próstata, sabe-se que seu aumento acompanha a curva de crescimento dos vários atores de riscos, sobretudo os virais (RYAN; CAMPTON; MAYER, 2000).

Assim como no resto do mundo, as taxas de prevalência de câncer anogenital na América Latina também exibem aumento significativo. Países como Brasil, México, Colômbia, Venezuela e outros reportam alta taxa de incidência anual de câncer anogenital (FRAZER *et al.*, 2006).

A incidência de neoplasias de cólon, reto e ânus para 2006, no Brasil, foi estimada para cerca de 11.390 novos casos no gênero masculino, e 13.970 novos casos no gênero feminino, porém não se dispõe de dados específicos do câncer anal no país (TORRES NETO; PRUDENTE; SANTOS, 2007).

Existem poucas evidências obre a epidemiologia da infecção anal pelo HPV. Mulheres HIV-positivo ou negativo apresentaram maior prevalência do DNA do HPV na região anal do que na região genital, quando ambas foram analisadas na mesma paciente (PALEFSKY, 2010).

1.1.4 Carcinoma anal e HPV

O comportamento do câncer anal se baseia nas seguintes características: está associado à infecção crônica pelo HPV; é precedido por lesões precursoras não malignas, a lesão intra-epitelial escamosa anal (ASIL); demonstra predileção pela zona de transição celular de células escamosas para glandulares. As lesões pré-invasoras são classificadas como neoplasias intraepitelial anal Neoplasia Intra-

epitelial anal de alto grau (NIAa) e Neoplasia Intra-epitelial anal de baixo grau (NIAb) e estão associadas aos subtipos do HPV infectante (MELBYE; SMITH; WOHLFAHRT, 1996). As NIAa são prováveis precursoras do tumor invasivo, com clara associação com os tipos de HPV de alto risco (KREUTER *et al.*, 2005).

O câncer de ânus era considerado doença pouco frequente, mas a sua incidência está crescendo, principalmente do carcinoma de células escamosas (CCE). Em paralelo, tem sido constatado o aumento das infecções anogenitais por papilomavírus humano, que acomete 20% da população mundial sexualmente ativa (VILLA *et al.*, 2005). A relação causal entre esse vírus e o câncer do colo do útero está bem caracterizada e o mesmo tem sido observado, com o câncer de ânus (MANZIONE; NADAL; CALORE, 2003; MAGI *et al.*, 2006; TACHEZY *et al.*, 2007).

Castellsague (2008) aponta os fatores de riscos para o câncer anal. Aqueles são: a infecção viral (condiloma anal), coito anal, história de doenças sexualmente transmissíveis, mais de 10 parceiros sexuais, história de câncer cervical, vulvar ou vaginal, imunossupressão após transplante de órgãos; estes são: a infecção pelo vírus da imunodeficiência, o uso prolongado de corticosteróides e o tabagismo.

1.1.5 Rastreamento do carcinoma anal e seus precursores

Tem sido demonstrado a utilidade do exame de Papanicolaou no rastreamento de lesões intraepiteliais anais e carcinoma anal, podendo seu uso fazer a seleção de pacientes que devem se submeter a anoscopia (GERVAZ *et al.*, 2003; FRIEDLANDER; STIER; LIN., 2004).

A citologia do canal anal com escova só foi relatada como método de rastreamento para o carcinoma no final da década de noventa. Todavia, não havia nomenclatura bem definida e reproduzível entre os diferentes patologistas. Para sanar essa dificuldade, em 1988, foi desenvolvido e aprovado pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI), nos EUA, o “The Bethesda System” (TBS), que passou por revisão em 1991 e 2001 (CARVALHO, 2003) e propôs uniformizar as terminologias, assim como as condutas clínicas para cada classificação citológica (BETHESDA SYSTEM, 2005).

Devido ao risco do surgimento do tumor anal e a possibilidade de detecção das lesões precursoras, o uso dos esfregaços anais para citologia estão sendo utilizados para diagnósticos (LYTWYN, A., 2005). Segundo Fox *et al.* (2005) consideram que o uso dos esfregaços anais vem sendo realizado com eficácia

semelhante as das coletas cervicais, e com sensibilidade oscilando entre 42% e 98% e especificidade variando de 38% a 96%. Autores indicam a colposcopia anal para biópsias dirigidas quando a citologia mostra-se alterada e recomendam-na como método de rastreamento para populações de alto risco para o carcinoma anal (PALEFSKY, 2001; PIKETTY; DARRAGH, 2003; FRIEDLANDER; STIER; LIN, 2004; FOX *et al.*, 2005; VAJDIC *et al.*, 2005).

A sensibilidade e a especificidade relatadas indicam que o método é aplicável para acompanhamento de lesões sub-clínicas e com potencial oncogênico (JACYNTHO, 2005). Todavia, não encontramos na literatura consultada estudos que mostrassem a eficácia da citologia anal para detecção de lesões clínicas.

Qualquer anormalidade à citologia indica a possibilidade de lesões de alto grau na avaliação histológica. Nos pacientes assintomáticos e que apresentam a forma sub-clínica, designada com lesão intra-epitelial anal, o diagnóstico é feito através de anoscopia (JACYNTHO *et al.*, 2011). A importância da anoscopia é para definir os locais onde as biópsias serão feitas, o que confirmará o grau da lesão (PIKETTY; DARRAGH, 2003).

Neste sentido, Nadal e Manzione (2006) demonstraram a viabilidade da incorporação do exame de citologia e anoscopia com melhora para diagnóstico de lesão ano-retal HPV induzida na forma sub-clínica.

1.1.6 Alterações citológicas e histológicas manifestadas pelo HPV

Os efeitos citopáticos produzidos pelo HPV, podem ser visualizados nos esfregaços contendo células alteradas, conforme descrito por Eleutério Jr. *et. al.* (2004). Dentre estes efeitos destaca-se a coilocitose, a qual caracteriza-se pela presença de uma cavidade citoplasmática perinuclear clara e com borda citoplasmática periférica densa, associada a alterações nucleares. As alterações nucleares são representadas por aumento do volume nuclear, irregularidade da membrana nuclear, cromatina grosseira e mal distribuída. Uma outra alteração consiste na disqueratose, caracterizada por células que apresentam ceratinização anômala ou prematura, nem sempre acompanhada de características nucleares de malignidade (ELEUTERIO JR. *et. al.*, 2004).

A associação de coilócitos e disqueratose tem sido considerada como critério citológico patognomônico para o diagnóstico da infecção pelo HPV.

Entretanto, com o uso desses sinais, a frequência do diagnóstico é de 1 a 2% em pacientes assintomáticas (SCHNEIDER *et al.*, 1987).

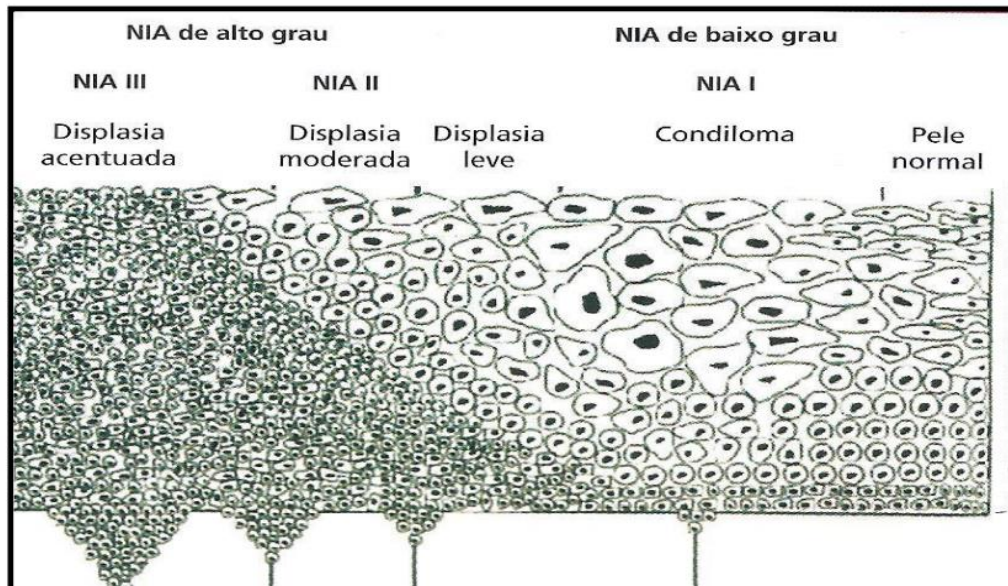
As anormalidades do epitélio escamoso anal, são denominadas como atipias em células escamosas de significado indeterminado (atypical squamous cells of undetermined significance-ASCUS), atipias em células escamosas de significado indeterminado nas quais não se pode excluir lesão de alto grau (ASC-H), lesões intraepiteliais escamosas (Squamous Intraepithelial Lesion-SIL), que podem ser de baixo grau (Low Grade Intraepithelial Lesion-LSIL), de alto grau (High Grade Intraepithelial Lesion-HSIL) atipias celulares de significado indeterminado (atypical squamous cells of undetermined significance-ASCUS), e carcinoma invasivo (BETHESDA SYSTEM, 2005; ARAIN *et al.*, 2005).

Vários termos foram usados para classificar essas alterações histológicas. Assim, as displasias leve, moderada e acentuada foram posteriormente denominadas neoplasia intraepitelial anal (NIA) dos tipos I, II e III (SURAWICZ *et al.*, 1995).

Mais recentemente, tem-se usado NIA de alto (NIAa) e baixo grau de malignização (NIAb), a saber: NIA I inclui a NIAb, e NIA II e III seriam a NIAa (SURAWICZ *et al.*, 1995) – (Figura 4). Essa classificação é a mais utilizada porque as lesões são agrupadas conforme seu comportamento biológico.

Segundo Piketty *et al.* (2006), os achados citológicos mais frequentes nas lesões escamosas intraepiteliais anais (NIA) são as células displásicas, as paraceratóticas e as bi ou multinucleares, enquanto os coilócitos são incomuns. No material colhido de NIAb, observa-se maior incidência de células escamosas, bi ou multinucleadas e moderadamente displásicas, seguidas dos paraceratócitos e coilócitos. Na NIAa, notam-se células com características de displasia moderada a acentuada e muitas células paraceratóticas atípicas. Entretanto, as características da NIAb podem ser vistas na NIAa.

Figura 1 – Classificação histopatológicas provocadas pelas atipias provocadas pela infecção do HPV



Fonte: Manzione, Nadal e Calore (2003).

1.2 Métodos de detecção de lesões HPV associadas

1.2.1 Citologia

1.2.1.1 Convencional

A citologia convencional, introduzida na década de 1940 por Papanicolau, permitiu a redução da incidência e a mortalidade por câncer de colo uterino (WRIGHT JR. *et al.*, 2002).

Na avaliação da acurácia do exame citológico convencional, encontrou-se valores de sensibilidade do método variando entre 68 e 80% e especificidade entre 79 e 99% (SOOST *et al.*, 1991; ABULAFIA; PEZZULLO; SHERER, 2003).

Trata-se de um exame de rastreamento, mas não de diagnóstico definitivo. Sua sensibilidade para detectar lesões de alto grau num único exame é relativamente baixa (50%), com número de falso-negativos que varia de 20 a 40% (MARTINS; RIBALTA, 2005).

1.2.1.2 Meio Líquido

A citologia em meio líquido é uma importante alternativa para o ganho de sensibilidade do exame de Papanicolaou e apresenta as seguintes vantagens (BAKER, 2002):

- Ganho de sensibilidade: menor perda de material coletado e melhor distribuição das células;
- Citologia em monocamada e com fundo mais limpo;
- Possível a realização do teste de Captura Híbrida a partir da mesma amostra;
- Redução de falsos negativos;
- Redução de casos insatisfatórios;
- Maior sensibilidade de Lesões de Baixo e Alto Grau.

1.2.2 Métodos biomoleculares

1.2.2.1 Captura híbrida de segunda geração

Nos últimos tempos o diagnóstico da infecção pelo HPV tem tido como potente arma a biologia molecular, que por sua alta sensibilidade, pode definir casos de infecção por HPV de alto risco e persistência viral (ELEUTÉRIO JR. *et al.*, 2007).

Atualmente, estão disponíveis diversos métodos moleculares, entre eles a reação em cadeia da polimerase (PCR), que se destaca por sua alta sensibilidade, e a captura de híbridos, que embora com menor sensibilidade em relação ao PCR esta diferença não é significativa (ELEUTÉRIO JR. *et al.*, 2007).

A captura híbrida de 2^o geração (hC2) é um ensaio simples, rápido, seguro e reprodutível que utiliza células esfoliadas obtidas tanto do trato genital feminino como do masculino. Pode ainda ser realizado em material de biópsia (HUBBARD, 2003).

Utiliza sondas de RNA altamente específicas para detectar tipos de HPV que mais comumente infectam o trato anogenital. O teste diferencia dois grupos: o grupo A, que possui sondas para HPV de baixo risco (6, 11, 42, 43, 44) e o grupo B,

que possui sondas para HPV de risco intermediário/alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) – (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Esses tipos representam 95% dos vírus que infectam o trato anogenital, sendo que os tipos do grupo intermediário/alto risco estão presentes em 99% dos casos de câncer. A sensibilidade é de 1 pg/ml de DNAHPV, equivalente a 0,1 cópia de vírus/célula. Todos os testes de Ch2 são, ao mesmo tempo, quantitativos e qualitativos (LANCELLOT *et al.*, 2000).

O teste de captura híbrida tem mostrado ter sensibilidade e especificidade satisfatória para uso rotineiro na análise da quantidade de DNA do grupo viral do HPV de baixo e alto risco (HO *et al.*, 1998).

Eleutério Jr. *et al.* (2010) concluem que os testes biomoleculares têm sido muito empregados mas há de se ter o cuidado da certeza de material celular adequado para pesquisa, o que é permitido por uma citologia em meio líquido prévia ou uso de controle interno ao teste.

2 JUSTIFICATIVA

Pouco se tem estudado sobre a prevalência das infecções por HPV, das lesões intraepiteliais anais como possíveis precursoras do câncer anal. A multicentricidade da infecção pelo HPV permite conjecturar sobre a possibilidade de se encontrar infecção por HPV e lesões intra-anais entre mulheres com lesões genitais, havendo a necessidade de identificar qual seria a frequência de tal associação e quais os fatores de risco associados, bem como os métodos adequados para rastreio e diagnóstico.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a prevalência de DNA-HPV de baixo e alto risco oncogênico, e de alterações citológicas do canal anal por citologia entre mulheres com lesão intraepitelial genital, bem como identificar os fatores de risco associados.

3.2 Específicos

- Identificar a prevalência de DNA-HPV anal de baixo e de alto risco por captura híbrida entre mulheres com e sem lesão genital HPV associada;
- Identificar a prevalência de citologia em meio líquido intra-anal alterada entre mulheres com e sem lesão genital HPV associada;
- Identificar fatores de risco para presença de DNA-HPV anal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Este estudo faz parte das pesquisas que envolvem seres humanos e que foi desenvolvido pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia (Mestrado), seguindo os requisitos da Resolução 196 de 1996.

O projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC), sob número de registro: CEP/MEAC nº 124/11 (Anexo A) juntamente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (Apêndice B).

4.2 Casuística

Um estudo prospectivo de corte transversal, descritiva, foi realizado na Universidade Federal do Ceará (UFC) de agosto de 2011 a setembro de 2012. Foram incluídas mulheres a partir de 18 anos ($n = 150$: Grupo estudo $n= 80$ e Grupo controle $n= 70$), submetidas a exame de genitoscopia no Ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia (PTGIC) da UFC. Conforme a genitoscopia das pacientes, as mesmas foram incluídas em um grupo de estudo (mulheres com lesões genitais HPV associadas) e um grupo controle (mulheres sem lesões HPV associadas). Foram obtidas informações sobre idade, tabagismo, métodos contraceptivos, paridade, prática anoreceptiva, número de parceiros sexuais e citologia cervical.

As participantes foram esclarecidas quanto aos objetivos do estudo, riscos e benefícios associados a pesquisa e assegurado a inteira confidencialidade dos registros. Após concordarem, assinaram a declaração do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e responderam a uma Ficha de Triagem com um Questionário padrão (modificado de ALENCAR *et al.*, 2006).

4.2.1 Amostras

Foram incluídas mulheres referenciadas do serviço de ginecologia com hipótese de lesão de vulva, a partir de 18 anos no ambulatório de Patologia do Trato

Genital Inferior e Colposcopia da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC), da Universidade Federal do Ceará.

Foram excluídas as usuárias que compareceram ao serviço que estavam grávidas, portadoras de câncer e em tratamento quimioterápico, radioterápico, com diagnóstico laboratorial positivos para HIV e hepatites virais.

4.3 Métodos

4.3.1 Coleta das amostras

Após a genitoscopia procedeu-se a coleta da citologia intra-anal com escova (cytobrush) que foi fixada no kit de citologia em meio líquido da marca BD (SurePath).

Técnica de coleta:

- a) afastamento das nádegas para observar verrugas ou fissuras anais na porção externa do canal anal;
- b) introdução da escova *cytobrush* até o desaparecimento completo de suas cerdas, cerca de 3 cm do esfíncter anal externo chegando a alcançar a linha pectínea, evitando contato com as lesões externas, quando existentes; a seguir foi realizado movimento de rotação em 360⁰ no sentido horário (Figura 2).
- c) Com cuidado, a “escova” era retirada, e a porção superior desconectada e colocada em um tubo com 10 mL de solução conservante a base de etanol do SurePath, cujo objetivo é preservar as células, possibilitando tanto o estudo molecular como a preparação do esfregaço para a coloração de Papanicolaou (Figura 3);
- d) após a transferência da parte proximal da escova *cytobrush* para dentro do frasco e desprezada a haste, o frasco foi fechado, identificado com as iniciais das pacientes e com seu respectivo número de protocolo, levado ao laboratório de anatomia patológica e processado para confecção de esfregaços. Após conservado a temperatura entre 2⁰C a 8⁰C foram realizados os testes de captura híbrida (Figura 3).

Figura 2 – Procedimento para coleta de citologia do canal anal



Fonte: Casos estudados (PRIMÁRIA).

Figura 3 – Vial de Surepath para fixação do material antes do processamento



Fonte: BD SurePath™ liquid-based Pap Test.

4.3.2 Citologia em meio líquido

A técnica de Citologia em Meio Líquido (CML) empregada no trabalho foi a do Sistema BD SurePath™ (Liquid-based Pap Test). Esta técnica tem como princípio transferir todo material celular coletado para um meio líquido, com propriedade de preservar as estruturas morfológicas e as moleculares, como as proteínas e os ácidos nucleicos. Para a preparação da lâmina citológica, o material é submetido a processos técnicos laboratoriais, como homogeneização e filtragem, que visam retirar hemácias, *debris* celulares, muco e infiltrado inflamatório. Com isso, o espécime na lâmina se apresenta bastante fino e uniforme, em monocamada e com distribuição celular homogênea. Após a confecção dos esfregaços, os

mesmos foram submetidos a técnica colorimétrica de Papanicolaou em corador automático marca Cellstain-15 e montados em lamínula.

A leitura foi feita em microscópio óptico Nikon eclipse e 200 por citopatologista segundo parâmetros do Sistema Bethesda (BETHESDA SYSTEM, 2005). Os laudos foram dados como: negativo para malignidade e lesão intraepitelial escamosa (NML), células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), células escamosas atípicas que não permitem excluir uma lesão de alto grau (ASC-H), Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) e Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL).

4.3.3 Captura híbrida de 2ª geração (hC2)

A realização do exame de Captura Híbrida segunda geração, utilizou-se o Kit da Qiagen®.

Amostras contendo o DNA pesquisado (no caso, DNA do HPV) foram hibridadas com um ácido ribonucléico específico. O híbrido resultante foi capturado pela superfície do tubo de ensaio previamente marcado com um anticorpo anti-híbrido ácido ribonucléico/DNA. O híbrido imobilizado reagiu com um anticorpo conjugado a fosfatase alcalina e foi detectado com um substrato quimioluminescente. Como o substrato é clivado pela fosfatase alcalina, uma luz foi emitida a qual é medida como unidades relativas de luz em um luminômetro. A intensidade da luz emitida foi proporcional à quantidade de DNA pesquisado nas amostras das pacientes. A hC2 é um método de amplificação de sinal, a qual é uma extensão do ensaio de sonda direto, porém mais sensível por causa da adição de camadas de moléculas sinalizadoras presentes em sondas de DNA (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Os cinco passos sequenciais da técnica de Captura Híbrida, consistem: 1º - Passo Desnaturação do Espécime; 2º - Passo Hibridização com sonda RNA; 3º - Passo Captura do Híbridos; 4º - Passo Reação com o Conjugado e o 5º - Passo Amplificação dos sinais dos Híbridos por Quimioluminescência.

O ensaio conta com controles negativos e positivos, que são testados em triplicata. As leituras dos controles são utilizadas para a validação e o cálculo do *cut-off*.

Há ainda dois outros controles intra-teste. O primeiro é quando se faz a adição do reagente de desnaturação. Todas as amostras devem tornar-se de cor roxa, isso dá a certeza de que todo material será desnaturado. O segundo, quando

da adição das sondas, a coloração deve mudar de roxo para amarelo, assegurando que todas as amostras receberam a quantidade ideal de sonda (NONNENMACHER *et al.*, 2002; QIAGEN, 2010).

4.4 Análise estatística

Os questionários foram devidamente revisados pelo pesquisador e tiveram os dados digitados no programa Microsoft Excel 2007, sendo posteriormente analisados em computador com recursos estatísticos do software Graphpad Prism 6.0.

Foram realizados os testes do Qui quadrado e o teste de Fisher (variáveis categóricas) além do teste t de Student (variáveis contínuas). O teste do Qui quadrado foi aplicado com o objetivo de encontrar um valor de dispersão para as três variáveis nominais – Citologia anal em meio líquido, Presença de DNA HPV e HPV de Baixo e Alto risco, nas amostras de espécimes biológicas do canal anal em mulheres envolvidas na Pesquisa.

O teste paramétrico utilizado para comparação entre duas populações foi o teste de t Student, pois nos estudo desenvolvido trata-se a amostras independentes e tem como objetivo testar que as populações que deram origem a essas amostras podem ser consideradas semelhantes ou não.

Foi incluído também o cálculo do Risco Relativo (RR) para calcular os fatores do risco de interesse do estudo. Essa correlação foi maior quanto mais o valor do RR se afasta de 1, com respectivos intervalos de confiança (95%), utilizando aproximação de Katz.

5 RESULTADOS

Foram avaliadas 150 mulheres imunocompetentes divididas em dois grupos: um grupo formado por mulheres diagnosticadas com lesão intraepitelial genital (vulva, vagina, colo ou períneo/Periânus) (n = 80) e um grupo controle composto por mulheres sem lesão intra-epitelial genital (n= 70).

A idade variou de 18 a 68 anos (média = $33,8 \pm 14,28$) no grupo de estudo e de 19 a 75 anos (média = $40,4 \pm 15,1$) no grupo controle ($p=0.0073$). Em relação ao número de parceiros sexuais as mulheres com lesão intraepitelial genital HPV associada apresentaram uma média de ($2,3 \pm 2,1$), enquanto as do grupo controle mostraram uma média de ($3,09 \pm 4,3$) ($p= 0.1620$). Sobre o início da vida sexual, os grupos apresentaram idades variando entre 13 a 25 anos no grupo de estudo (media = $17,5 \pm 3,5$) enquanto no grupo controle variou de 13 a 29 anos (média = $17,4 \pm 3,6$) ($p=0.8770$).

Quanto à paridade o grupo com lesões intraepiteliais genitais apresentou uma média de ($1,6 \pm 2,0$), variando de 0 a 10 gestações, enquanto no grupo de mulheres sem lesões variou de 0 a 12 gestações (média= $1,7 \pm 2,1$) ($p= 0.3772$). A prática de coito anal foi referida por 44(55%) mulheres no grupo de estudo e por 34 (48,7%) no grupo controle ($p=0.4317$). Dentre estas o uso de condon na prática receptiva anal foi referido por 25(31,2%) no grupo de estudo e em 16(22,8%) no grupo controle ($p=0.2499$). O tabagismo foi admitido por 25 mulheres (31,25%) no grupo de estudo, contra 23 (32,4%) no grupo controle ($p=0.8333$). (Tabela 1).

Tabela 1 – Características sócio-comportamentais dos grupos de estudo (com lesão genital HPV associada) e controle (sem lesão genital HPV associada) em mulheres imunocompetentes, no período de agosto de 2011 a setembro de 2012. (n=150)

	Sem lesão HPV associada (n=70)	Com lesão HPV associada (n=80)	p*
Idade em anos (média/DP)	40,48(±15,01)	33,88(±14,28)	0.0073*
Parceiros sexuais (média/DP)	3,09(±4,33)	2,3(±2,1)	0.1620*
Início de vida sexual (média/DP)	17,4(±3,6)	17,5(±3,5)	0.8770*
Gestações (média/DP)	1,7(±2,1)	1,6(±2,0)	0.3772*
Coito anal [n (%)]			
Não	36 (51,4%)	36 (45%)	0.4317**
Sim	34 (48,7%)	44 (55%)	
Uso de Condon no Sexo anal [n (%)]			
Não	54(77,4%)	55(68,7%)	0.2499**
Sim	16(22,8%)	25(31,2%)	
Tabagismo [n (%)]			
Não	47(66,2%)	55(68,75%)	0.8333**
Sim	23(32,4%)	25(31,25%)	

DP= Desvio padrão; HPV= Papiloma Virus Humano; * Teste t de Student; **Teste do qui-quadrado.

Entre os tipos de métodos relatados, o uso de anticoncepcional hormonal foi relatado por 13 pacientes (15,25%) do grupo de estudo e 18 do grupo controle (16,7%) (p= 0.6635). Apenas 1 paciente (0,1%) do grupo sem lesão genital era usuária do Dispositivo Intra uterino (DIU). No grupo de estudo, 13 pacientes (16,25%) referiam ter realizado laqueadura tubária bilateral, enquanto no grupo controle, 12(17,1%) realizaram o procedimento (p=0.8836). O uso de condon foi relatado como método contraceptivo por 10 pacientes (12,5%) do grupo de mulheres com lesão e 8 pacientes (11,4%) do grupo controle (p= 0.8403) – (Tabela 2).

Tabela 2 – Métodos de Contracepção usados pelos grupos de estudo (com lesão genital HPV associada) e controle (sem lesão genital HPV associada) em mulheres imunocompetentes, no período de agosto de 2011 a setembro de 2012. (n=150)

	Sem lesão HPV associada (n=70)	Com lesão HPV associada (n=80)	p*
Anticoncepcional hormonal [n (%)]	18(16,7%)	13(15,25%)	0.6635*
Dispositivo Intra uterino [n (%)]	01(0,1%)	0(0%)	0.2834*
Condon [n (%)]	08(11,4%)	10(12,5%)	0.8403*
Laqueadura Tubária [n (%)]	12(17,1%)	13(16,25%)	0.8836*
Não pratica a Contracepção [n (%)]	27(38,5%)	36(47,5%)	0.2709*

HPV= Papiloma Virus Humano; *Teste do qui-quadrado.

As lesões de herpes simples genital foram evidenciadas ao exame em 3 (3,75%) pacientes do grupo em estudo e em 10 (14,2%) do grupo controle ($p=0.0221$). Em relação ao quadro sugestivo de sífilis, confirmada laboratorialmente, foi observado em 1 paciente (1,25%) do grupo estudo e 3 (4,2%) pacientes do grupo controle ($p=0,2496$). O Líquen escleroso não foi observado nas pacientes com lesão HPV associada, mas 8 (11,2%) das pacientes do grupo controle as tinham ($p=0.0018$). Cistos sebáceos, não foram encontrados em pacientes do grupo estudo, mas foram observados em 2 (2,8%) pacientes do grupo controle ($p=0.1280$). (Tabela 3).

Tabela 3 – Lesões genitais no grupo estudo (com lesão genital HPV associada) e controle (sem lesão genital HPV associada) em mulheres imunocompetentes, no período de agosto de 2011 a setembro de 2012. (n=150)

	Sem lesão HPV associada (n=70)	Com lesão HPV associada (n=80)	p*
Herpes Simples [n (%)]	10(14,2%)	3(3,75%)	0.0221*
Sífilis Secundária [n (%)]	03(4,2%)	1(1,25%)	0.2496*
Líquen Escleroso [n (%)]	08(11,4%)	0(0%)	0.0018*
Cistos Sebáceos [n (%)]	02(2,8%)	0(0%)	0.1280*

HPV= Papiloma Virus Humano; *Teste exato do qui-quadrado.

Em relação aos achados na citologia do canal anal, quadros interpretados como negativo para malignidade ou lesão intraepitelial anal (NML) foram observados em 56 pacientes (70%) do grupo das mulheres com lesão genital HPV associada e 58(82,9%) nas mulheres do grupo controle ($p=0.0847$). Os casos com atipias foram assim distribuídos: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US): em 11 pacientes (13,7%) do grupo de estudo e 8 (11,4%) pacientes do grupo controle ($p=0.8069$); Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LISL) em 13 casos (16,2%) e 4 controles (5,7%)($p=0.0423$). Nenhuma das pacientes dos dois grupos apresentou lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) – (Tabela 4).

Tabela 4 – Laudos de citologia intra-anal em meio líquido (SurePath) dos grupos de estudo (com lesão genital HPV associada) e controle (sem lesão genital HPV associada) em mulheres imunocompetentes, no período de agosto de 2011 a setembro de 2012. (n=150)

	Sem lesão HPV associada (n=70)	Com lesão HPV associada (n=80)	p*
NML [n (%)]	58(82,9%)	6(7%)	0.0847*
ASC – US [n (%)]	8(11,4%)	11(13,7%)	0.8069*
LSIL [n (%)]	4(5,7%)	13(16,3%)	0.0423*

HPV= Papiloma Virus Humano; NML= Negativo para Malignidade e lesão intra-epitelial; ASC-US= células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL= Lesão intra-epitelial de baixo grau; *Teste do qui-quadrado sem correção de Yates.

Considerando-se os resultados da citologia anal em meio líquido e comparando-se quadros sem atipia com ASC-US/LSIL, pode-se observar que a idade variou de 25 a 57 anos (média=38,1±14,7) no grupo com citologia típica e de 17 a 75 anos (média=37,1±17,4) no grupo com citologia atípica (p=0.0821). Em relação ao número de parceiros, as mulheres com citologia normal apresentaram uma média de 2,5±3,8, enquanto as do grupo com atipia mostraram uma média de (3,3±3,5); (p= 0.2598;). Quanto à paridade as mulheres com citologia normal apresentaram uma média de (1,63±2,04) quando comparado ao grupo de mulheres com citologia alterada cuja média foi de (2,11±2,05) (p= 0.2248). Dentre as 114 pacientes do grupo com citologia negativa para malignidade, 56(49,12%) praticavam coito anal e 33(28,7%) usavam condon nas relações; entre as 36 mulheres com citologia anal atípica, 22(61,1%) referiram prática anoreceptiva e apenas 9(25%) o uso de condon nas relações anais. Com relação ao tabagismo 28 pacientes (24,56%) entre as mulheres com citologia negativa para malignidade afirmaram ter o hábito de fumar e 9(25%) entre aquelas com atipia citológica não fumavam (p=0.9576). Com relação à história de prática contraceptiva 24(21,5%) pacientes com citologia negativa e 7(19,4%) com citologia atípica afirmaram fazer uso de contracepção hormonal (p=0.8354) (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição das características sócio-comportamentais relacionadas as atipias citológicas do canal anal pelo método de citologia em base líquida (SurePath). (n=150)

	NML (n=114)	ASC-US+ (n=36)	p*
Idade em anos (média/DP)	38,1(±14,7)	37,1(±17,4)	0.0821*
Parceiros sexuais (média/DP)	2,5(±3,8)	3,3(±3,5)	0.2598*
Gestações (média/DP)	1,63(±2,04)	2,11(±2,05)	0.2248*
Coito anal [n (%)]	56(49,12%)	22(61,1%)	0.2094*
Uso de Condon no coito anal [n (%)]	33(28,07%)	9(25%)	0.6456**
Tabagismo [n (%)]	28(24,56%)	9(25%)	0.9576**
Contraceção Hormonal [n (%)]	24(21,05%)	7(19,4%)	0.8354**

DP= Desvio padrão; NML= Negativo para Malignidade e lesão intra-epitelial; ASC-US+= células escamosas atípicas de significado indeterminado e LSIL= Lesão intra-epitelial de baixo grau; * Teste t de Student; **Teste do qui-quadrado.

Com relação aos sítios de lesão genital associados a citologia anal pode-se observar que 27 casos (48,2%) de mulheres com lesão de colo de útero, tinham citologia anal em meio líquido diagnosticadas como NML, 2 casos (18,1%) com resultado de ASC-US e 1 caso (7,6%) com citologia positiva para LSIL (p=0.0223; RR=0.3289). Quanto as mulheres com lesões vaginais 15 (26,7%) tiveram citologia negativa para malignidade e 2(15,3%) com resultado para LSIL. Não foram encontrados lesões vaginais associadas ao diagnóstico de ASC-US (p=0.3642). No grupo com mulheres com lesões de vulva, 10 (17,8%) tinham citologias NML, enquanto 5(45,4%) casos apresentaram ASC-US e 4(30,7%) LSIL. (p= 0.0157; RR= 2.4442). Já nas mulheres com lesões de períneo e perianus observou-se que 4 (7,1%) casos tinham citologia anal negativa, enquanto 4 (36,3%) tinham citologia anal para ASC-US e 6(46,1%) como LSIL (p=0.0003; RR= 3.7385). Das pacientes com citologia anal negativa para malignidade, a maioria tinham lesões de colo de útero (48,2%) e as pacientes com ASC-US e LSIL anal representaram as mulheres com lesão de vulva (76,1%), períneo e perianus (82,4%) (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição dos sítios de Lesões Intra-epiteliais genitais relacionadas as alterações citológicas do canal anal pelo método de citologia em base líquida SurePath. (n=80)

	NML (n=56)	ASC-US (n=11)	LSIL (n=13)	p*	RR**
Colo [n (%)]	27 (48,2%)	2(18,1%)	1 (7,6%)	0.0223*	0.3289**
Vagina [n (%)]	15 (26,7%)	0(0%)	2 (15,3%)	0.3642*	
Vulva [n (%)]	10(17,8%)	5(45,4)	4 (30,7%)	0.0157*	2.4442**
Períneo e Perianus [n (%)]	4(7,1%)	4(36,3%)	6 (46,1%)	0.0003*	3.7385**

NML= Negativo para Malignidade e lesão intra-epitelial; ASC-US= células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL= Lesão intra-epitelial de baixo grau; *Teste exato de Fisher; **Risco relativo com intervalo de confiança de 95%, usando aproximação de Katz.

Com relação a identificação de DNA-HPV por Captura híbrida de segunda geração (hC2) pode-se observar que a idade variou entre 15 a 75 anos (média=33,95±14,16) no grupo com (hC2)HPV(+) e entre 18 a 67 anos (média=38,58±15,3) no grupo com HPV(-) (p=0,0651). Quanto ao número de parceiros, as mulheres com (hC2)HPV(+) apresentaram uma média de 2,74±3,06, enquanto as pacientes do grupo com (hC2)HPV(-) mostraram uma média de 2,88±3,74(p= 0.8326). Levando-se em conta a paridade as mulheres com HPV(+) apresentaram uma média de 1,74±2,04 e as mulheres com HPV(-) de 2,19±2,34 (p= 0.2678). Dentre as 66 pacientes com (hC2)HPV(+), 35(53%) praticavam coito anal e 13(19,6%) usavam condon nas relações; Entre as 84 mulheres com (hC2)HPV(-), 45 (51,1%) referiram prática anoreceptiva sendo 28(33,3%) usuárias de condon nas relações anais.

Com relação ao tabagismo 17 (25,7%) pacientes, entre as mulheres com (hC2)HPV(+), afirmaram ter o hábito de fumar e 20(23,8%) entre aquelas com (hC2)HPV(-) não fumavam (p=0.7835). Com relação à história de prática contraceptiva 16 (24,2%) mulheres com presença de HPV na captura híbrida e 20 (13,8%) com (hC2)HPV(-) afirmaram fazer uso de contracepção hormonal (p=0.9509). Já as lesões genitais associadas ao HPV ou não estavam presentes em 39(59%) nas mulheres com (hC2)HPV(+) e 41(48,8%) em mulheres com (hC2)HPV(-) (p=0.2102). Especificamente dentre as com lesões clinicamente diagnosticadas como HPV associadas 39(48,7%) foram positivas para a hC2 (Tabela 7).

Tabela 7 – Distribuição das características sócio-comportamentais relacionadas a positividade de HPV no teste de Captura Híbrida de 2^o geração hC2. (n=150)

	(hC2)HPV(-) (n=84)	(hC2)HPV(+) (n=66)	Valor de p
Idade em anos (média/DP)	38,58(±15,3)	33,95(±14,16)	0.0651*
Parceiros sexuais (média/DP)	2,88(±3,74)	2,74(±3,06)	0.8326*
Gestações (média/DP)	2,19(±2,34)	1,74(±2,04)	0.2678*
Coito anal [n (%)]	43(51,1%)	35(53%)	0.8228**
Uso de Condon no coito anal [n (%)]	28(33,3%)	13(19,6%)	0.0681**
Tabagismo [n (%)]	20(23,8%)	17(25,7%)	0.7835**
Contraceção Hormonal [n (%)]	20(23,8%)	16(24,2%)	0.9509**
Lesões Genitais [n (%)]	41(48,8%)	39(59%)	0.2102**

DP= Desvio padrão; HPV= Papiloma Virus Humano; (hC2)HPV(-)= HPV negativo para o teste de Captura Híbrida de 2^o geração; (hC2)HPV(+)= HPV positivo para o teste de Captura Híbrida de 2^o geração; * Teste t de Student; **Teste do qui-quadrado.

Em relação a presença ou ausência de DNA HPV nos achados da citologia em base líquida (SurePath) do canal anal, nos quadros interpretados como negativo para malignidade e lesão intraepitelial anal (NML) foram observados que 64 (76,1%) não apresentavam DNA HPV e 50(75,7%) mostraram positividade com o DNA (p=0.9509). Já os casos com células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), 9(10,7%) não tinham o DNA enquanto 10 (15,1%) mostraram-se positivos (p= 0.4645). Já nos casos com Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) 6(9,1%) tiveram resultados para (hC2)HPV(-) e 11(13,1%) para (hC2)HPV(+)(p= 0.6051) (Tabela 8).

Tabela 8 – Relação entre os resultados da citologia anal em base líquida do canal anal e a presença de DNA HPV pelo método de hC2. (n=150)

	(hC2)HPV(-) (n=84)	(hC2)HPV(+) (n=66)	p*
NML [n (%)]	64(76,1%)	50(75,7%)	0.9509**
ASC - US [n (%)]	9(10,7%)	10(15,1%)	0.4645*
LSIL [n (%)]	6(9,1%)	11(13,1%)	0.6051*

HPV= Papiloma Virus Humano; (hC2)HPV(-)= HPV negativo para o teste de Captura Híbrida de 2^o geração; (hC2)HPV(+)= HPV positivo para o teste de Captura Híbrida de 2^o geração; NML= Negativo para Malignidade e lesão intra-epitelial; ASC-US= células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL= Lesão intra-epitelial de baixo grau; *Teste exato de Fisher; Teste do qui-quadrado**.

Considerando-se os dois grupos da pesquisa, mulheres com lesão genital HPV associado (grupo estudo) e mulheres sem lesão HPV associado (grupo

controle), com a classificação do HPV em risco oncogênico pode-se observar que as mulheres sem lesão e com lesão genital apresentaram respectivamente, 19(70,3%) e 19(48,7%) de HPV de baixo risco ($p=0.1280$) nas espécimes analisadas por Captura Híbrida. Quanto ao alto risco oncogênico, as pacientes do grupo controle tiveram 2(7,4%) de Papiloma vírus humano de baixo risco (HPV AR) enquanto as pacientes do grupo estudo 6(15,3%)($p=0.4555$). Verificando positividade para HPV de baixo e alto risco nos dois grupos, encontrou-se 6(22,2 %) em mulheres do grupo controle e 14(35,8 %) no grupo estudo (0.2840) (Tabela 9).

Tabela 9 – Prevalência de HPV de Baixo e Alto risco anal em mulheres imunocompetentes com e sem lesão genital HPV associada, no período de agosto de 2011 a setembro de 2012

	Sem lesão genital HPV associada (n=27)	Com lesão genital HPV associada (n=39)	p*
HPV BR [n (%)]	19(70,3%)	19(48,7%)	0.1280*
HPV AR [n (%)]	2(7,4%)	6(15,3%)	0.4555 *
HPV BR/AR [n (%)]	6(22,2%)	14(35,8 %)	0.2840*

HPV= Papiloma Vírus Humano; HPV BR= Papiloma Vírus Humano de baixo risco oncogênico; HPV AR= Papiloma Vírus Humano de alto risco oncogênico; HPV BR/AR= Papiloma Vírus Humano de baixo e alto risco oncogênico *Teste exato de Fisher.

Os resultados da citologia em base líquida relacionados a tipificação do HPV em Baixo e Alto risco mostraram que os casos interpretados com negativo para malignidade e lesão intra-epitelial anal (NML) tiveram presença de 29(75,3%) e 5(62,5%) HPV BR e AR ($p=0.4124$), respectivamente. Já Os casos com células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), 5(13,1%) apresentaram HPV BR enquanto 2(25%) HPV AR ($P= 0.5874$). Já nos resultados referentes as Lesões intra-epiteliais de baixo grau (LSIL), 4(10,5%), mostraram HPV de baixo risco oncogênico e 1(12,5 %) HPV de alto risco ($p=1.0000$) – (Tabela 10).

Tabela 10. Prevalência de HPV de Baixo e Alto risco associados aos resultados da citologia em base líquida do canal anal em mulheres imunocompetentes no período de agosto de 2011 a setembro de 2012

	HPV BR (n=38)	HPV AR (n=8)	p*
NML [n (%)]	29(75,3%)	5(62,5%)	0.4124*
ASC – US [n (%)]	5(13,1%)	2(25%)	0.5874*
LSIL [n (%)]	4(10,5 %)	1(12,5 %)	1.0000*

HPV= Papiloma Vírus Humano; HPV BR= Papiloma Vírus Humano de baixo risco oncogênico; HPV AR= Papiloma Vírus Humano de alto risco oncogênico; HPV BR/AR= Papiloma Vírus Humano de baixo e alto risco oncogênico; NML= Negativo para Malignidade e lesão intra-epitelial; ASC-US= células escamosas atípicas de significado indeterminado; LSIL= Lesão intra-epitelial de baixo grau; *Teste exato de Fisher.

Figura 4 – Exame de citologia em meio líquido (SurePath) de canal anal evidenciando Células escamosas negativas para malignidade sem atipias (400x)

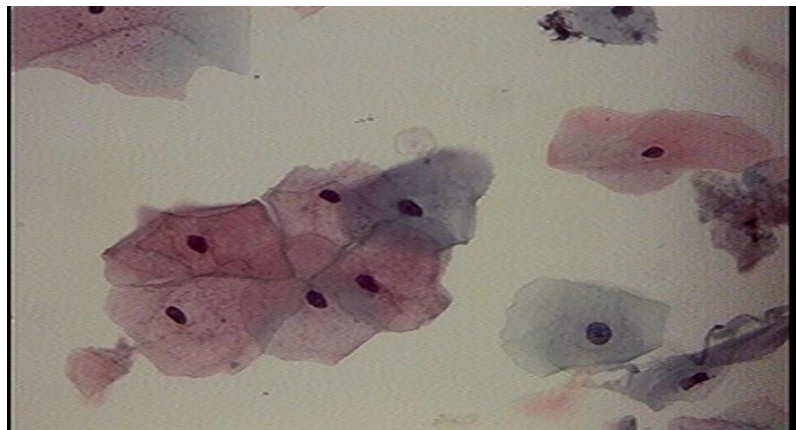


Figura 5 – Exame de citologia em meio líquido (SurePath) de canal anal evidenciando Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) (400x)

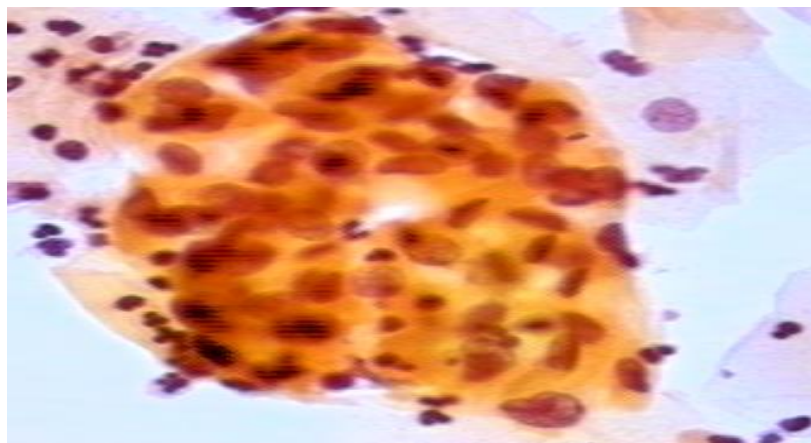


Figura 6 – Exame de citologia em meio líquido (SurePath) de canal anal evidenciando Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) (100x)

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos com um aumento de casos de carcinoma anal muito se tem estudado suas relações com HPV e coito anal, em especial entre homens HIV positivos (MANZIONE; NADAL; CALORE, 2003). No entanto, como há uma maior frequência deste tipo de lesão entre mulheres em relação aos homens (NADAL; MANZIONE, 2006), tornou-se importante avaliar este grupo, em especial as imunocompetentes.

Percebeu-se que a média relacionada a idade para o grupo de mulheres com lesão foi menor quando comparado ao outro grupo. Esses dados são esperados pois pesquisas demonstram que a faixa etária de maior incidência para infecção do HPV está entre 20 e 35 anos de idade (NADAL; NADAL 2008; HAMPL SARAJUURI; WENTZENSEN, 2008; CHIAO, 2009).

A associação dos fatores sócio-comportamentais com a presença ou ausência de lesões HPV associadas mostrou-se inexistente. Não encontrou-se qualquer correlação estatisticamente significativa entre esta infecção e alguns fatores aparentemente importantes, tais como número de parceiros sexuais, início de vida sexual, gestações, tabagismo, uso de condom e coito anal.

Estudos mostram que outros fatores estão associados ao HPV, tais como trauma, inflamação local, sexo anal receptivo, imunossupressão e tabagismo (RYAN; CAMPTON; MAYER, 2000).

Tachezy *et al.* (2007) afirmam que constituem fatores de risco para infecção anal pelo HPV alguns hábitos de vida e práticas sexuais, tais como múltiplos parceiros, atividade bissexual, coito anal, multiparidade e uso de drogas injetáveis. Imunodepressão, história pessoal de câncer cervical ou vulvar (ou lesões precursoras), mulheres com prática de coito anal e as mulheres com história de neoplasia em colo uterino.

Outros pesquisadores afirmam a predisposição genética, nutrição, tabagismo, nível socioeconômico, virulência do HPV e a concomitância com outras infecções sexualmente transmissíveis (*Chlamydia trachomatis*, *herpesvírus*, por exemplo) possam estar atuando como co-fatores para as lesões anogenitais (BOSCH *et al.*, 1995; CASTELLSAGUE, 2008).

No que se refere ao coito anal, existe a possibilidade de que a análise desta variável tenha limitações importantes, pois houve uma dificuldade em agrupar as participantes na categoria de prática anoreceptiva, devido a grande

heterogeneidade de faixa etária e por ser um tabu cultural. Acreditamos que essa discordância tenha ocorrido devido à omissão desse dado por alguns pacientes do nosso estudo.

Embora sabendo que este fator comportamental esteja implicado na gênese das lesões escamosas intraepiteliais anogenitais, neste estudo não mostrou significância estatística. Jacyntho (2005) comenta que o coito anal desprotegido mostrou-se associado à ASIL – lesões no canal anal em pacientes sem imunossupressão, concluindo que a prática de sexo anal sem condon foi relevante.

Quanto uso ao de condon no sexo anal, não houve diferença significativa entre os grupos estudo e controle nessa pesquisa. Mais da metade das mulheres pesquisadas não fazem uso do preservativo.

Estatísticas norte-americanas sugerem, em números absolutos, que as mulheres praticam sexo anal sem proteção numa proporção de 7:1 em relação aos homossexuais masculinos (NADAL *et al.*, 2007).

Apesar de a Internacional Agency for Research on Cancer (IARC) classificar o tabagismo como um co-factor importante para o desenvolvimento de lesões anogenitais, neste estudo, não houve correlação significativa. Os efeitos do tabagismo no desenvolvimento da doença incluem a redução da resposta imunitária, alteração de mecanismos relacionados com o metabolismo de hormônios femininos e os danos causados diretamente por substâncias cancerígenas relacionadas com o tabaco (AMARAL *et al.*, 2009). Atualmente, o tabagismo é não é considerado por Oliveira *et. al.* (2011) fator de risco para carcinogênese na população brasileira, pois poucas mulheres fumam.

Quanto à relação entre métodos contraceptivos, não houve correlação estatisticamente significante. Um estudo prospectivo mostrou aumento da atividade transformadora dos oncogenes do HPV e interferência na resolução das lesões genitais causadas pelo vírus. Não há estudos na literatura sobre a ação dos anticoncepcionais na gênese de lesões anais HPV induzidas (TEIXEIRA *et al.*, 2002; SMITH *et al.*, 2007; PINTO; BARBOSA; PAIVA, 2012).

Outro estudo corrobora com a hipótese de que as usuárias dos contraceptivos hormonais não possuem mais chance de aquisição da infecção pelo HPV ou mesmo de permanecer com a infecção pelo HPV por maior período, em relação às não usuárias (VACCARELLA *et. al.*, 2006).

Pereira (2006) afirma que as Doenças Sexualmente Transmissíveis causadas *Herpes simples*, *Clamídia trachomatis*, gonorréia, *Trichomonas vaginalis* são condições que podem ser facilitadoras da ação do HPV para o desenvolvimento e progressão da lesão intraepitelial. Este mesmo autor, em estudo com mulheres em idade fértil, conseguiu associar o Herpes simples a persistência de infecções por HPV e tenta justificar que as DST's parecem atuar como fatores na ativação dos mecanismos de transformação celular desencadeando um processo de inflamação crônica e reduzindo a imunidade local.

Com as lesões genitais evidenciadas em mulheres que participaram do estudo o líquem escleroso mostrou-se mais evidente naquelas sem lesões HPV associadas, ou seja, após a quarta década de vida cuja literatura mostra esta relação.

Analisando as atipias citológicas, 30% das mulheres com lesão por HPV mostraram presença de alteração em células do canal anal por citologia em meio líquido e verificou-se que Lesões de baixo grau estão mais associadas à pacientes com HPV.

Segundo Park e Palefsky (2006), o achado de atipias de significado indeterminado em células epiteliais (ASCUS) na citologia anal deve servir de sinal de alerta para a neoplasia intraepitelial anal.

Giraldo, Eleutério Jr. *et al.* (2009), em um estudo com 184 mulheres brasileiras mostrou que havia uma importante associação entre lesões intra-epiteliais cervicais e lesões intra-epiteliais anais. Foi encontrada uma prevalência de 17,4% de lesões anais nas pacientes com lesões genitais, e apenas 3,2% nas pacientes sem lesões genitais.

O estudo de Harry *et al.* (2006) demonstrou que no intervalo de dois anos, durante o estudo, a LSIL anal progrediu para HSIL em 62% das HIV-positivo e 36% pacientes HIV-negativo, por conseguinte, indicando que as pacientes com LSIL estão em risco significativo de progressão da doença. Estes argumentos apóiam a importância da citologia anal neste grupo.

Por outro lado, a mucosa anal pode ser um reservatório de HPV que pode sendo fonte de reinfecção para a cérvix. Parece não haver associação entre a prática de sexo anal e a prevalência de anormalidades citológicas cervicais (CALORE; GIACCIO; NADAL, 2011).

Embora não apresentando significância estatística na relação entre as atipias citológicas ASC-US e LSIL, as Lesões anais de baixo grau mostraram-se mais frequentes em pacientes com HPV. Um estudo envolvendo mulheres com doenças na vulva teve uma diferença não estatisticamente significativa ($p = 0,10$) (HAMPL; SARAJUURI; WENTZENSEN, 2008).

Uma possível relação entre lesão intraepitelial escamosa anal (ASIL) e lesão intraepitelial escamosa genital (GSIL) foi pesquisado por Scholefield *et al.* (2005), Melbye, Smith e Wohlfahrt (1996).

Moscicki *et al.* (2003) mostraram a prevalência e os riscos para anormalidades citológicas anais em mulheres jovens heterossexuais. Deste grupo de mulheres, 3,9% apresentaram citologia anal anormal. Jacyntho (2005) ressalta que a taxa de citologia anal anormal é semelhante à encontrada para colo uterino na população geral feminina.

Embora a ocorrência de cânceres cervical uterino e anal seja um fato importante em pessoas com AIDS, muitos ou todos esses cânceres resultam de doença-HPV e não propriamente da imunodeficiência (GOEDERT, 2000). Parece haver uma similaridade de comportamento da carcinogênese cervical e anal, corroborando a hipótese de que a prevalência das lesões precursoras do câncer de ânus deve ser maior no grupo de mulheres com lesões precursoras do câncer cervical, conforme demonstrado por Scholefield *et al.* (2005).

Haga *et al.* (2001) também detectaram alterações cromossômicas semelhantes em ASIL e câncer de colo uterino, sugerindo que o mecanismo carcinogênico anal seja o mesmo que o cervical uterino.

Um estudo envolvendo 200 mulheres mostrou que o número de parceiros foi descrito como um fator mais fortemente associado as alterações citológicas anais, sendo que a maior parte da infecção é subclínica (CHIAO, 2009).

O número de gestações, coito anal, uso de condon na prática anoreceptiva, tabagismo e contracepção não mostraram relação entre NML e ASC-US(+) na citologia anal em meio líquido, neste estudo. Não encontrou-se na literatura estudos que permitissem comparação de resultados.

Quanto aos sítios com lesões de períneo e perianus ($p= 0.0003$), Vulva ($p= 0.0157$) e Colo Uterino ($p=0.0223$), estes mostraram uma associação com as atipias citológicas sugerindo que mulheres com lesões nestes sítios tem maior risco de alterações na citologia anal.

Jacyntho (2005) demonstra que o sítio com maior potencial isolado de associação com ASIL é o perianal, sendo 21,4 vezes mais relacionado com ASIL, enquanto o colo, a vagina e a vulva ficaram entre sete e dez vezes mais associados com ASIL quando se comparou, isoladamente, cada sítio acometido com os demais.

Diziam Brux *et al.* (1987) que o HPV perde poder oncogênico à medida que ganha poder infectante, efeito visível morfológicamente nas lesões intraepiteliais. Esse efeito era as atipias nucleares marcantes, com poucos coilócitos nas lesões de alto grau e quase nenhuma atipia nuclear, com muitos coilócitos nas lesões de baixo grau, denotando alta infectividade, o que explica o grande número de LG-ASIL sobrevividas de GSIL perianal, provavelmente por contigüidade, por causa do alto potencial de contaminação na maioria das lesões de baixo grau. Por isso, as mulheres portadoras de GSIL perianal de baixo grau merecem atenção quanto a possíveis lesões no canal anal (ASIL) – (JACYNTHO, 2005).

Pereira (2006) sugere que o sexo anal receptivo esteja relacionado com alterações anais, alguns outros estudos não encontraram associação entre o sexo anal e a infecção pelo HPV sugerindo que outras formas de transmissão do HPV estejam envolvidas, como o contato genital mesmo sem penetração e também por meio de mãos e boca (LAW *et al.*, 1991; MOSCICKI *et al.*, 2003; WINER *et al.*, 2006).

Jacyntho *et al.* (2005) sugeriram que os fatores de risco associados à citologia anal anormal foram a história de sexo anal, de SIL cervical e infecções anais por HPV.

Neste estudo não foi encontrada associação significativa entre o DNA HPV e os co-fatores, mesmo mostrando que a idade continua sendo a variável onde a presença do DNA foi mais relevante em mulheres adultas jovens. Torna-se curioso perceber que o coito anal foi pouco praticado por estas mulheres, embora o uso de condon nessas mostrou-se maior nas mulheres com DNA HPV(-).

Carvalho (2003) e Del Prette *et al.* (2008) encontraram uma maior prevalência de DNA HPV intra-anal em mulheres entre 20 anos e 30 anos (45,7% e 32,6%, respectivamente), enquanto Sellors, Karwalajtys e Lytwym (2003) observaram as mais altas taxas na faixa etária de 30 a 40 anos (44,8% e 24%, respectivamente).

Neste estudo apenas três pacientes tinham lesões simultâneas em perianus e vulva. Todos os outros apresentavam apenas um sítio acometido. Apesar da maioria dos estudos se referir à região genital, Melbye, Smith e Wohlfahrt (1996)

afirmam que resultados similares aos genitais são obtidos na região anal quanto a presença de DNA do HPV.

Esta pesquisa não demonstrou associação significativa entre presença de DNA HPV anal e as atipias citológicas do canal anal. Um estudo de metanálise demonstrou a prevalência do DNA HPV por Captura Híbrida no carcinoma anal 84,3%, nas lesões intraepiteliais anais de baixo grau 91,5% e nas lesões intraepiteliais anais de alto grau 93,9% (HUGO et. al., 2009).

Observando a presença do HPV e a sua classificação oncogênica, percebeu-se que mulheres com Lesão HPV associadas apresentaram uma maior associação a presença de HPV anal quando comparadas àquelas sem lesão HPV associadas, onde o HPV de alto risco esteve presente na maioria das mulheres com lesão.

Devido os resultados não demonstrarem uma associação do HPV com a presença de lesão genital ou citologia anormal, quando comparados os grupos de estudo, parece que a presença tão somente do HPV é insuficiente para se caracterizar um risco de lesão. Mais estudos são necessários para melhor estabelecer estas relações com desenho de coorte e resultados histopatológicos finais.

Muito ainda tem que ser estudado em populações maiores e em especial tendo como padrão-ouro o exame histopatológico de biópsias guiadas por anoscopia, que foi uma forte limitação do estudo. Serão necessários também novos estudos para evidenciar se há alguma superioridade de citologia em meio líquido sobre a citologia convencional. No entanto, os achados sugerem que determinadas mulheres deveriam ser rastreadas para lesão intra-anal, aquelas com lesões cervicais, vulvares e perianais e que o melhor método para rastreamento seria a citologia intra-anal.

7 CONCLUSÕES

A presença de DNA HPV anal não foi estatisticamente significativa quando comparadas as mulheres sem e com lesão genital HPV associado.

A presença de lesão HPV associada em colo, vulva e perianus estiveram mais associadas com citologia intra-anal alterada.

Com exceção de idade, nenhuma outra variável sócio-comportamental esteve associada à positividade do teste de HPV ou citologia alterada.

REFERÊNCIAS

- ABULAFIA, O.; PEZZULLO, J. C.; SHERER, D. M. Performance of ThinPrep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey. **Gynecol. Oncol.**, v. 90, p. 137-144, 2003.
- ALENCAR, D. K. C.; MALTA, D. A.; MOURA, E. C.; A.; CASTRO, A. M.; NETO, O. L. M. Padrão de atividade física em adultos brasileiros: resultados de um inquérito por entrevistas. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 18, n. 1, p. 7-16, 2009.
- AMARAL, J. C.; CÂMARA, M. E. B. S.; MORAIS, P. G. M.; BARROS, L. D. F.; LINS, NETO, M. A. F. Associação de Lesões Anorretais em Portadoras de Infecção Genital por HPV e Neoplasia Cérvico-Uterina. **Rev. Bras. Coloproct.**, v. 29, n. 2, p. 203-208, 2009.
- ARAIN, S.; WALTS, A. E.; THOMAS, P.; BOSE, S. The anal pap smear: cytomorphology of squamous intraepithelial lesions. **Cytojournal.**, v. 2, n. 1, p. 4, 2005.
- BAKER, J. J. Conventional and liquid-based cervicovaginal cytology: a comparison study with clinical and histologic follow-up. **Diagn. Cytopathol.**, v. 27, p. 185-188, 2002.
- BETHESDA SYSTEM 2001. **Terminology**. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2005. [cited 2005 Sep. 29]. Disponível em: <<http://bethesda2001.cancer.gov/terminology.html>>. Acesso em: 12 nov. 2012.
- BORGES, A.; SCHOR, N. Início da vida sexual na adolescência e relações de gênero: um estudo transversal em São Paulo. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, p. 499-507, 2005.
- BOSCH, F. X.; MANOS, M. M.; MUÑOZ, M.; SHERMAN, M.; JANSEN, A. M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M. H.; MORENO, V.; KERMAN, R.; SHAN, K. V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, N. 11, p. 796-802, 1995.
- BRENTJENS, M. H.; YEUNG-YUE, K. A.; LEE, P. C.; TYRING, S. K. Human papillomavirus: a review. **Dermatol. Clin.**, v. 20, p. 315-331, 2006.
- BRUX, J.; BARRASSO, R.; COUPEZ, F.; LONESCO, M. Human papilloma viruses and cervical intraepithelial neoplasia: the role of colposcopy. **Gynecologic Oncology**, v. 27, p. 197-207, 1987.
- CALORE, E. E.; GIACCIO, C. M.; NADAL, S. R. Prevalence of anal cytological abnormalities in women with positive cervical cytology. **Diagn. Cytopathol.**, v. 39, n. 5, p. 323-327, 2011.

- CAMPOS, R. R.; MELO, V. H. de; Del CASTILHO, D. M.; NOGUEIRA, C. P. F. Prevalência do papilomavírus humano e seus genótipos em mulheres portadoras e não-portadoras do vírus da imunodeficiência humana. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 27, n. 5, p. 248-256, maio 2005.
- CARTER, J. J.; MADELEINE, M. M.; SHERA, K.; CUSHING-HAUGEN, K. L.; WF, G. C.; PORTER, P.; DALING, J. R.; McDOUGALL, J. K.; GALLOWAY, D. A. Human papillomavirus 16 and 18L1 serology compared across anogenital cancer sites. **Cancer Res.**, v. 61, n. 5, p. 1934-1940, Mar. 2001.
- CARVALHO, C. R. N. Conhecendo o hospedeiro: epidemiologia das neoplasias mais comuns do trato-genital inferior. In: CONHECENDO o HPV. Patologia do tratogenital inferior colposcopia e CAF. São Paulo: Frôntis, 2003. (Collectanea Symposium).
- CASTELLSAGUE, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecol Oncol.**, v. 110, n. 3, p. 4-7, 2008. Supplement 2.
- CAVALCANTI, S. M.; ZARDO, L. G.; PASSOS, M. R.; OLIVEIRA, L. H. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. **J. Infection**, v. 40, p. 80-87, 2000.
- CHIAO, E. Y. Duration of anal human papillomavirus infection among immunocompetent women: clues to anal cancer epidemiology and possible prevention strategies. **Clin. Infec. Dis.**, v. 4, n. 5, p. 547-549, 2009.
- DEL PRETTE, R.; TARANTO, A. M.; LIPSI, M. R.; NIRCHIO, V.; ANTONETTI, R. Prevalence and genotypes identification of human papillomavirus infection in a population of South Italy. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, p. 211-214, 2008.
- ELEUTÉRIO JR., J.; BARROS, I. C.; CAVALCANTE, D. I. M.; ELEUTÉRIO, R. M. N.; GIRALDO, P. C. HPV-DNA Hybrid capture test influence of cellularity in penile samples. **Acta Cytol.**, v. 54, p. 546-550, 2010.
- ELEUTÉRIO JR., J.; CAVALCANTE, J. R.; SANTIAGO, R. O.; SILVA, D. S. Citologia oncológica, colposcopia e histologia no diagnóstico de lesões epiteliais do colo uterino. **NewsLab.**, v. 12, p. 126-132, 2004.
- ELEUTÉRIO JR., J.; GIRALDO, P. C.; GONÇALVES, A. K. S.; CAVALCANTE, D. I. M.; FERREIRA, F. V. A.; MESQUITA, S. M.; MORAIS, S. S. Prognostic markers of high-grade squamous intraepithelial lesions: the role of p16INK4a and high-risk human papillomavirus. **Acta Obst. Gynecol. Scand.**, v. 86, p. 94-98, 2007.
- FOCCHI, J.; BOVO, A. C.; SILVA, I. D. C. G. **Papiloma Vírus Humano (HPV), 2000.** Disponível em: <<http://www.sogesp.com.br>>. Acesso em: 15 jun. 2012.
- FOX, P. A.; SEET, J. E.; STEBBING, J.; FRANCIS, N.; BARTON, S. E.; STRAUSS, S. et al. The value of anal cytology and human papillomavirus typing in the detection of anal intraepithelial neoplasia: a review of cases from an anoscopy clinic. **Sex. Transm. Infect.**, v. 81, p. 142-146, 2005.

- FRANCO, E. L.; VILLA, L. L.; RUIZ, A.; COSTA, M. C. Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high risk types. **J. Infect. Dis.**, v. 72, p. 756-763, 1995.
- FRAZER, I. F.; COX, J. T.; MAYERAUX Jr., E. J.; FRANCO, L. E.; MOSCICKI, A. B.; PALEFSK, J. M.; FERRIS, D. G.; FERENCZY, A. S.; VILLA, L. L. Advances in prevention of cervical cancer and other human papilloma virus* related diseases. **Pediatric Infect. Dis. J.**, p. 565-581, 2006.
- FRIEDLANDER, M. A.; STIER, E.; LIN, O. Anorectal cytology as a screening tool for anal squamous lesions: cytologic, anoscopic, and histologic correlation. **Cancer J.**, v. 102, p. 19-26, 2004.
- GERVAZ, P.; ALLAL, A. S.; VILLIGER, P.; BUHLER, L.; MOREL, P. Squamous cell carcinoma of the anus: another sexually transmitted disease. **Swiss Med. Wkly**, v. 133, p. 353-359, 2003.
- GIRALDO, P. C.; ELEUTÉRIO JR., J.; GONÇALVES, A. K. S.; ELEUTÉRIO, R. M. N.; BARBOSA, R. C. C.; BRITO, A. C. M.; CAVALCANTE, D. I. M. Vitamin A and cervical squamous intraepithelial lesions. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 88, p. 366, 2009.
- GIRALDO, P. C.; JACYNTHO, C.; COSTA, C.; IGLESIAS, M.; GONDIM, C.; CARVALHO, F.; GIRALDO, H.; GONÇALVES, A. K. Prevalence of anal squamous intra-epithelial lesion in women presenting genital squamous intra-epithelial lesion. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 142, n. 1, p. 73-75, Jan. 2009.
- GIRALDO, P. C.; SILVA, M. J. P. M. A.; FEDRIZZI, E. N.; GONÇALVES, A. K. S.; AMARAL, R. L. G.; ELEUTÉRIO JR., J.; FIGUEIREDO, I. V. Prevenção da Infecção por HPV e Lesões Associadas com o Uso de Vacinas. **DST. J. Brasil. D. Sex. Transm.**, v. 20, p. 132-140, 2008.
- GOEDERT, J. J. The epidemiology of acquired immunodeficiency syndrome malignancies. **Semin. Oncol.**, v. 27, n. 4, p. 390-401, Aug. 2000.
- GUIMARÃES, A. P.; MATOS, D.; SEGRETO, R.; FORONES, N. M. Carcinoma Espinocelular de Canal Anal: análise de 11 casos. **Arq. Gastroenterologia**, v. 38, n. 1, p. 9-13, 2007.
- HAGA, T.; KIM, S. H.; JENSEN, R. H.; DARRAGH, T.; PALEFSKY, J. M. Detection of genetic changes in anal intraepithelial neoplasia (AIN) of HIV-positive and HIV-negative men. **J. Acquir. Immune Defic Syndr.**, v. 26, n. 3, p. 256-262, 2001.
- HAMPL, M.; SARAJUURI, H.; WENTZENSEN, N. Effect of human in HIV-Negative and HIV-Positive men who have sex with men. Curr Infect Intraepithelial neoplasia following treatment. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, v. 100, p. 175-180, 2008.
- HARRY, B.; HERBEST, R. S.; BAJORIN, R. F.; BRUCE, E. J.; LEVIN, B. et al. **Clinical cancer advances 2005**: major research advances in cancer treatment,

prevention, and screening – a report from the American Society of Clinical Oncology. Alexandria: American Society of Clinical Oncology, 2006. VA 22314.

HAUSEN, Z. H. **Infections causing human cancer**. Weinheim, New York: Wiley-VCH, 2006, p. 1-517.

HERRERO, R.; HILDESHEIN, A.; BRATTI, C.; SHERMAN, M. E.; HUTSHINSON, M.; MORALES, J.; BALMACEDA, I.; GREENBERG, M. D.; ALFARO, M.; BURK, R. D.; WACHOLDER, S.; PLUMMER, M.; SCHIFFMAN, M. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 92, n. 6, p. 464-474, 15 Mar. 2000.

HUBBARD, R. A. Human papillomavirus testing methods. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 127, p. 940-945, 2003.

HUGO, D. V.; CLIFFORD, G. M.; NASCIMENTO, M. C.; MADELEINE, M. M. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: A meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 124, p. 1626-1636, 2009.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Globocan, 2005. Disponível em: <<http://www.dep.iarc.fr/GLOBOCAN/references.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

JACYNTHO, C. M. A.; GIRALDO, P. C.; HORTA, A. A.; GRANDELLE, R.; GONÇALVES, A. K.; FONSECA, T.; ELEUTÉRIO JR., J. Association between genital intraepithelial lesions and anal squamous intraepithelial lesions in HIV-Negative women. **Am. J. Obst. Gynecol. (Print)**, v. 205, p. 1-105, 2011.

JACYNTHO, C. M. A. **Prevalência de lesão intra-epitelial escamosa anal em mulheres com lesão intra-epitelial escamosa genital**. 2005. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.

KREIMER, A. R.; CLIFFORD, G. M.; BOYLE, P.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 14, p. 467-475, 2005.

KREUTER, A.; HOCHDORFER, B.; WEISSENBORN, S. J.; STUCKER, M.; SWOBODA, J. Clinical spectrum and virologic characteristics of anal intraepithelial neoplasia in HIV infection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 52, p. 603-608, 2005.

LANCELOTTI, C. L. P.; LEVI, E. J.; MALG, S.; SCHWARZSCHILD, M.; NICOLAU, S. M. Diagnóstico laboratorial. In: CONSENSO BRASILEIRO DE HPV, 1., 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Bg Produções Culturais, 2000. p. 1-142.

LAW, C. L.; THOMPSON, C. H.; ROSE, B. R.; COSSART, Y. E. Anal intercourse: a risk factor for papillomavirus infection in women?. **Genitourin Med.**, v. 67, p. 464-468, 1991.

LIAW, K. I.; GLASS, A. G.; MANOS, M. M.; GREER, C. E.; SCOTT, D. R.; SHERMMAN, M.; BURK, R. D.; KURMAN, R. J.; RUSH, B. B.; CADELL, D. M.; LAWLER, P.; TABOR, D. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 91, p. 954-960, 2000.

LYTWYN, A.; SALIT, I. E.; RABOUD, J.; CHAPMAN, W.; DARRAGH, T.; WINKLER, B.; TINMOUTH, J.; MAHONY, J. B.; SANO, M. Interobserver agreement in the interpretation of anal intraepithelial neoplasia. **Cancer**, v. 103, n. 7, p. 1447-1456, 2005.

MAGGARD, C. A.; BEANES, S. R.; KOCY, A. Anal canal cancer – a population-based reappraisal. **Dis. Colon. Rectum.**, v. 46, p. 1517-1524, 2003.

MAGI, J. C.; BRITO, E. M. S.; GRECCO, E. T. O.; PEREIRA, M. S. M.; FORMIGA, J. S. G. Prevalência de papilomavirus humano (HPV) anal, genital e oral, em ambulatório geral de coloproctologia. **Rev. Bras. Colo-Proctol.**, v. 26, p. 233-238, 2006.

MANZIONE, C. R.; NADAL, S. R.; CALORE, E. E. Postoperative follow-up of anal condylomata acuminata in HIV-positive patients. **Dis. Colon. Rectum.**, v. 46, p. 1358-1365, 2003.

MARTINS, N. V.; RIBALTA, J. C. **Patologia do trato genital inferior**. São Paulo: Roca, 2005.

MELBYE, M.; SMITH, E.; WOHLFAHRT, J. Anal and cervical abnormality in women prediction by human papillomavirus tests. **Int. J. Cancer**, v. 68, n. 5, p. 559-564, 1996.

MOLANO, M.; POSSO, H.; WEIDERPASS, E.; van den BRULE, A. J.; RONDEROS, M.; FRANCESCHI, S.; MEIJER, C. J.; ARSLAN, A.; MUNOZ, N.; HPV STUDY GROUP HPV STUDY. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. **Br. J. Cancer**, v. 87, n. 3, p. 324-333, 2002.

MOSCICKI, A. B.; DURAKO, S. J.; HOUSERJ, M. Y., MURPHY, D. A.; DARRAGH, T. M.; FARHAT, S.; WILSON, C. M. Human papillomavirus infection and abnormal cytology of the anus in HIV-infected and uninfected adolescents. **AIDS**, v. 17, n. 3, p. 311-320, 2003.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUE, X.; GONZALEZ, A. B. de. HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S3/1-S10, 2006. Supplement 3.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; CASTELLSAGUÉ, X.; DIAZ, M.; SAN JOSÉ, S. de; HAMMOUDA, D.; SHAH, K. V.; MEIJER, C. J. L. M. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. **Int. J. Cancer**, v. 111, p. 278-285, 2003.

NADAL, L. R. M.; NADAL, S. R. Doenças Sexualmente Transmissíveis. Indicações da Vacina Contra o HPV. **Rev. Bras. Colo-Proctol.**, v. 28, n. 1, p. 124-125, 2008.

NADAL, S. R.; CALORE, E. E.; NADAL, L. R.; HORTA, S. H.; MANZIONE, C. R. Anal cytology for screening of pre-neoplastic lesions. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 53, n. 2, p. 147-151, Mar./Apr. 2007.

NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R. Papilomavirus Humano e o Câncer Anal. **Rev. Bras. Coloproct.**, v. 26, n. 2, p. 204-207, 2006.

_____. Identificação dos grupos de risco para as doenças sexualmente transmissíveis. **Rev. Bras. Coloproct.**, v. 23, p. 128-129, 2003.

NONNENMACHER, B.; BREITENBACH, V.; VILLA, L. L.; PROLLA, J. C.; BOZZETTI, M. C. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Rev. Saúde Pública*, v. 36, n. 1, p. 95-100, fev. 2002.

PALEFSKY, J. M.; HOLLY, E. A.; EFIRDC, J. T.; COSTA, M.; NAOMI, J.; BERRY, J. M.; DARRAGH, T. M. Anal intraepithelial neoplasia in the highly active antiretroviral therapy era among HIV-positive men who have sex with men. **AIDS**, v. 19, p. 1407-1414, 2005.

PALEFSKY, J. M. Diseases of the anus. In: KRUM, N. Lee. **Diagnostic gynecologic and obstetric pathology**. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier, 2001.

PALEFSKY, J. M. Human papillomavirus and anal neoplasia. **Curr. HIV/AIDS Rep.**, v. 5, p. 78-85, 2010.

PARK, I. U.; PALEFSKY, J. M. Evaluation and management of anal intraepithelial neoplasia papillomavirus vaccines on vulvar, vaginal, and anal intraepithelial lesions and vulvar cancer. **Obstet. Gynecol.**, v. 108, n. 6, p. 1361-1368, 2006.

PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. **Int. J. Cancer**, v. 94, p. 153-156, 2005.

PEREIRA, C. R. **Fatores de risco para lesões intra-epiteliais anais: um estudo de caso-controle no serviço de patologia do HUAP**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2006.

PINTO, V. F. C.; BARBOSA, V. F. C.; PAIVA, S. G. Aspectos epidemiológicos e citológicos da infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) em adolescentes: uma revisão. **Araguáia, Revista Científica do ITPAC**, v. 5, n. 4, pub. 4, 2012.

PIKETTY, C.; DARRAGH, J. M. High Prevalence of anal human Papillomavirus infection and anal cancer precursors among HIV- infected persons in the absence of anal intercourse. **Ann. Intern. Med.**, v. 138, p. 143-149, 2003.

PIKETTY, C.; DARRAGH, T. M.; DA COSTA, M.; BRUNEVAL, P.; HEARD, I.; KAZATCHKINE, M. D.; PALEFSKY, J. M. High prevalence of anal human

papillomavirus infection and anal cancer pre-cursors among HIV-infected persons in the absence of anal intercourse. **Ann. Intern. Med.**, v. 138, p. 453, 2006.

RYAN, D. P.; CAMPTON, C. C.; MAYER, R. J. Carcinoma of the anal canal. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, p. 798-800, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory.** 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SAN JOSÉ, S.; PALEFSKY, J. Cervical and anal HPV infections in HIV-positive women and men. **Virus Research**, v. 89, p. 201-211, 2007.

SCHNEIDER, A.; MEINHARDT, G.; De-VILLIERS, E. M.; GISSEMANN, L. Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV- DNA hybridization studies. **Diagn. Cytopathol.**, v. 3, p. 250-255, 1987.

SCHOLEFIELD, J. H.; OGUNBIYI, O. A.; RAFTERY, A. T.; SMITH, J. H. F.; DUFFY, S.; ROGERS, K. Prevalence of anal human papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia in renal allograft recipients. **British Journal of Surgery**, v. 81, p. 101-120, 2005.

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUANA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **Int. J. Gynecology Cancer**, v. 15, p. 727-746, 2005.

SELLORS, J. W.; KARWALAJTYS, T. L.; LYTWYM, A. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. **Canadian Medical Association Journal**, v. 168, p. 421-425, 2003.

SMITH, J. S.; LINDSAY, L.; HOOTS, B.; KEYS, J.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. **International Journal of Cancer**, p. 621-632, 2007.

SOOST, H. J.; LANGE, H. J.; LEHMACHER, W.; RUFFING-KULLMANN, B. The validation of cervical cytology: sensitivity, specificity, and predictive values. **Acta Cytol.**, v. 35, n. 1, p. 8-14, 1991.

STOLLER, M. H. Advances in cervical screening technology. **Pathol.**, v. 13, p. 275-284, 2000.

SURAWICZ, C. M.; CRITCHLOW, C.; SAYER, J.; HURT, C.; HAWES, S.; KIRBY, P.; GOLDBAUM, G.; KIVIAT, N. High grade anal dysplasia in visually normal mucosa in homosexual men: seven cases. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 90, p. 1776-1778, 1995.

TACHEZY, R.; JIRASEK, T.; SALAKOYA, M.; LUDVIKOVA, V.; KUBECOVA, M.; HORAK, L. Human papillomavirus infection and tumours of the anal canal: correlation of histology, PCR detection in paraffin sections and serology. **APMIS**, v. 115, n. 3, p. 195-203, 2007.

TEIXEIRA, J. C.; DERCHAIN, S. F. M.; CABELLO, S. T. S.; ZEFERINO, L. C. Avaliação do Parceiro Sexual e Risco de Recidivas em Mulheres Tratadas por Lesões Genitais Induzidas por Papilomavírus Humano (HPV). **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 24, n. 5, 2002.

THOMAS, C.; WRIGHT JR., M. D.; LYNNETE, D.; LOUISE, K.; ATTILA, L. HPV DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer. **JAMA**, v. 283, n. 1, p. 81-86, 2000.

TORRES NETO, J. R.; PRUDENTE, A. C. L.; SANTOS, R. L. Estudo demográfico do câncer de canal anal e ânus no estado de Sergipe. **Rev. Bras. Coloproct.**, v. 27, n. 2, p. 190-195, 2007.

VACCARELLA, S.; HERRERO, R.; DAI, M.; SNIJDERS, P. J.; MEYGER, C. J.; THOMAS, J. O.; HOANG ANH, P. T.; FERRECCIO, C.; MATOS, E.; POSSO, H.; DE SANJOSÉ, S.; SHIN, H. R.; SUKVIRACH, S.; LAZCANO-PONCE, E.; RONCO, G.; RAJKUMAR, R.; QIAO, Y. L.; MUÑOZ, N.; FRANCESCHI, S. Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 15, n. 11, p. 2148-2153, 2006.

VAJDIC, C. M.; ANDERSON, J. S.; HILLMAN, R. J.; MEDLEY, G.; GRULICH, A. E. Blind sampling is superior to anoscope guided sampling for screening for anal intraepithelial neoplasia. **Sex. Transm. Infect.**, v. 81, p. 415-428, 2005.

VILLA, L. L.; COSTA, R. L.; PETTA, C. A.; ANDRADE, R. P.; AULT, K. A.; GIULIANO, A. R. Prophylatic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 e 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. **Lancet Oncol.**, London, v. 6, p. 271-278, 2005.

WINER, R. L.; LEE, S. K.; HUGHES, J. P.; ADAN, D. E.; KIVIAT, N. B.; KOUTSKY, L. A. Genital human. **Clin. Infec. Dis.**, v. 42, p. 586, 2006.

WRIGHT JR.; COX, J. T.; MASSAD, L. S.; TWIGGS, L. B.; WILKINSON, M. D.; ASCCP-SPONSORED CONSENSUS CONFERENCE. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalitie for the 2001 **JAMA**, v. 287, n. 16, p. 2120-2129, 2002.

XI, L. F.; SCHIFFMAN, M.; KOUTSKY, L. A.; HE, Z.; WINER, R. L.; HULBERT, A.; LEE, S. K.; KE, Y.; KIVIAT, N. B. Persistence of newly detected human papillomavirus type 31 infection, stratified by variant lineage. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 3, p. 549-555, 2013.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

LESÃO INTRA-EPITELIAL ANAL E DNA-HPV DE BAIXO E ALTO RISCO, COM ÊNFASE NOS GENÓTIPOS 16, 18 E 45, EM MULHERES COM LESÃO INTRA-EPITELIAL GENITAL E FATORES DE RISCOS ASSOCIADOS EM UM SERVIÇO DE REFERÊNCIA NA CIDADE DE FORTALEZA-BRASIL

Eu, _____, _____ anos
portadora da identificação n. _____ endereço

_____ cidade de _____ registrada no ambulatório de Ginecologia e

Colposcopia da MEAC – UFC, prontuário n. _____, declaro concordar por minha livre e espontânea vontade em participar dessa pesquisa que objetiva conhecer a Prevalência de LESÃO INTRA-EPITELIAL ANAL E DNA-HPV DE BAIXO E ALTO RISCO, COM ÊNFASE NOS GENÓTIPOS 16, 18 E 45, EM MULHERES COM LESÃO INTRA-EPITELIAL GENITAL E FATORES DE RISCOS ASSOCIADOS EM UM SERVIÇO DE REFERÊNCIA NA CIDADE DE FORTALEZA-BRASIL

, que será desenvolvido e realizado no Ambulatório de Ginecologia e Colposcopia da Maternidade Escola Assis Cheateubriam pelo Programa de Mestrado em Patologia da Universidade Federal do Ceará, pelo aluno Givanildo Carneiro Benicio orientado e supervisionado pelo Prof. Dr. José Eleutério Junior.

Com essa colaboração poderemos traçar a relação entre câncer anal em mulheres com câncer genital através de citologia anal e genital, captura híbrida e biopsia, se necessário.

Consciente diante do Estudo e seus objetivos, estou sabendo que:

- a) Serei examinada pelos profissionais envolvidos na Pesquisa onde será colhido células (citologia e biologia molecular) e ou fragmentos (biopsia) anal e vaginal. Os procedimentos podem causar desconforto temporário e não trarão prejuízos na função nem estrutural a mim;

- b) Não serei beneficiada em participar do Estudo, a não ser recebendo o laudo dos exames que a mim foram direcionados e serei conduzida a especialistas quando houver necessidade;
- c) Tenho o direito de receber respostas sobre minhas dúvidas a respeito da Pesquisa e dos resultados dos exames citológicos, biologia molecular e de biopsia;
- d) Tenho o direito de abandonar a Pesquisa quando eu achar necessário sem que me traga prejuízos atuais e no futuro tanto a mim quanto a minha família;
- e) As informações a meu respeito jamais serão elucidadas usando minha identificação (meu nome);
- f) Qualquer dúvida que eu tenha a respeito da pesquisa e minha inserção nela poderei entrar em contato com o aluno Givanildo Carneiro Benicio e o Professor Dr. José Eleutério pelos telefones (85) 8641 5491 (86) 9934 3693 e ----- de segunda a sexta feira entre 8h e 17h ou com o Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Ceará pelo telefone -----.

Fortaleza, ___ de _____ de 2012.

Colaboradora

Givanildo Carneiro Benicio
MESTRANDO

Apêndice B – Questionário

LESÃO INTRA-EPITELIAL ANAL E DNA-HPV DE BAIXO E ALTO RISCO, COM ÊNFASE NOS GENÓTIPOS 16, 18 E 45, EM MULHERES COM LESÃO INTRA-EPITELIAL GENITAL E FATORES DE RISCOS ASSOCIADOS EM UM SERVIÇO DE REFERÊNCIA NA CIDADE DE FORTALEZA-BRASIL

NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO: ()

1. Idade _____ anos
2. Cor _____
3. Escolaridade _____
4. Etilista _____ Tabagista _____
5. Contracepção _____
6. G__P__A__ Nascidos Vivos _____
7. Tipo de parceiros sexuais _____ Número de parceiros _____
8. Início da atividade sexual _____
9. DST's _____ identificação da DST _____
10. Tratamento de HPV, verruga ou câncer genital _____
11. Uso de drogas ilícitas _____
12. Parceiro com HPV, verruga ou câncer no pênis _____ Número de relações por mês _____
13. Coito anal _____ Uso de camisinha _____
14. Aparecimento de doença anal _____
15. Sangramento anal _____
16. Algum parceiro bissexual _____

Resultado dos Exames

CITOLOGIA: NML () ASC () LSIL () HSIL () CA ()

DNA – HPV: POSITIVO () NEGATIVO ()

GENOTIPAGEM: HPV 16 () HPV 18 () HPV 45 ()

ANUSCOPIA:

BIOPSIA:

ANEXOS

Anexo A – Parecer do Comitê de ética em Pesquisa

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

MATERNIDADE-ESCOLA ASSIS CHATEAUBRIAND

Rua Coronel Nunes de Melo, S/Nº - Rodolfo Teófilo - C.G.C. 07.206.048/0001-08

PABX: (085) 4009-8523 - Fax: (085) 4009-8515

CEP 60430-270 - Fortaleza - Ceará - Brasil

Ofício CEP/MEAC nº 124/11

Fortaleza, 08 de agosto de 2011.

Protocolo nº 70/11

Pesquisador responsável: Givanildo Carneiro Benício.

Título Do Projeto: DNA-HPV e lesão intra-epitelial anal em mulheres com lesão intra-epitelial genital e fatores de risco associados

Levamos ao conhecimento de V. S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand da Universidade Federal do Ceará – CEP/MEAC/UFC, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional da Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 29 de julho de 2011.

O Pesquisador deverá comparecer ao setor competente da Instituição, onde será realizada a pesquisa, para a confecção dos crachás, munido deste documento.

Igualmente, informamos que o mesmo deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,