

*UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA*

*MARIA GABRIELLE DE LIMA ROCHA*

**ANÁLISE DA CARGA VIRAL E DO ESTADO FÍSICO DO DNA-HPV 16 EM  
AMOSTRAS PENIANAS**

*Belo Horizonte  
2013*

MARIA GABRIELLE DE LIMA ROCHA

**ANÁLISE DA CARGA VIRAL E DO ESTADO FÍSICO DO DNA-HPV 16 EM  
AMOSTRAS PENIANAS**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.*

*Área de concentração: Ciências Farmacêuticas*

*Orientador: Dra. Ana Paula Salles Moura  
Fernandes*

*Coorientador: Dra. Paula Ávila Fernandes*

*Belo Horizonte  
2013*

R672a      Rocha, Maria Gabrielle de Lima.  
Análise da carga viral e do estado físico do DNA-HPV 16 em amostras penianas / Maria Gabrielle de Lima Rocha. – 2013.

110 f. : il.

Orientadora: Ana Paula Salles Moura Fernandes.  
Co-Orientadora: Paula Ávila Fernandes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. HPV – Homens - Teses. 2. Condiloma acuminado. – Teses. 3. Carcinoma peniano - Teses. 4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) - Teses. 5. Vírus papiloma - Teses. I. Fernandes, Ana Paula Salles Moura. II. Fernandes, Paula Ávila. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:616.925



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

U F M G

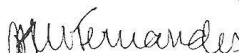
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

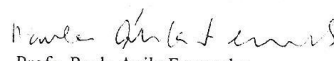
**ANÁLISE DA CARGA VIRAL E DO ESTADO FÍSICO DO DNA-HPV 16 EM AMOSTRAS PENIANAS**

**MARIA GABRIELLE DE LIMA ROCHA**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 02 de agosto de 2013, pela banca constituída pelos membros:

  
Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
Profa. Paula Avila Fernandes  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
Profa. Silvia Helena Rabelo dos Santos  
Universidade Federal de Goiás - UFG

  
Prof. Geraldo Brasileiro Filho  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
Profa. Sheila Jorge Adad  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

  
Profa. Annamaria Ravara Vago  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
Prof. Bruno Eduardo Fernandes Mota  
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 2 de agosto de 2013.

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico esse trabalho à minha família, em especial à minha mãe Francisca, meu pai Gabriel e ao Vitor.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus, a Osùn, aos meus mestres e guias;*

*A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Ana Paula Salles Moura Fernandes e minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Paula Ávila Fernandes pelo apoio e conhecimento compartilhado, pela paciência e dedicação, por me ensinarem o caminho a trilhar. Vocês foram muito importantes no desenvolvimento e conclusão deste trabalho;*

*Ao bolsista Raphael Freitas que me ajudou a superar a rotina árdua de um laboratório sendo minhas outras duas mãos;*

*Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular e Citologia Clínica pelo companheirismo e apoio, em especial Adriana e Míriam que compartilharam comigo angústias e sempre estiveram ali quando precisei, à Fabíola por todo estímulo, conhecimento e palavras de carinho.*

*A todos os professores, colegas e funcionários da Faculdade de Farmácia que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho;, em especial aos Professores Adriano, Lirlândia, Karina, Juçara e Vicente pela amizade, ajuda e confiança;*

*A professora Annamaria Vago do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e à pesquisadora Jaqueline Germano do Instituto de pesquisa Renè Rachou – FIOCRUZ, meu muito obrigado, pelo compartilhamento de conhecimento, pela participação ativa em nossas discussões e correções, por todo apoio e carinho.*

*Aos médicos da Policlínica Centro-Sul: Dr. Antônio Eduardo P. Fonseca, Dr. Virgílio Vieira Neto, Dra. Sibeles Corrêa Neto, Dra. Ana Carolina Gomes, pela colaboração e atenção. Por me ajudarem com carinho a obter os participantes deste trabalho. Ao Dr. Virgílio pelos seus ensinamentos, artigos e “aulas” que contribuíram, e muito, para meu amadurecimento como profissional sendo um exemplo a ser seguido. À enfermeira Leonor Gonçalves que sempre me apoiou e me incentivou, participando ativamente de muitas etapas desse trabalho;*

*À gerente da Policlínica Centro-Sul Dra. Maria Helena pelo apoio, confiança e permissão para a realização deste trabalho; agradeço por ter sempre deixado as portas abertas todas as vezes que precisei;*

*A todos os funcionários da Policlínica Centro-Sul que me receberam com carinho, principalmente à Selma e Vilma pela amizade e carinho;*

*À todos homens e mulheres que voluntariamente participaram desse trabalho;*

*A todos os meus amigos e familiares que sempre me apoiaram me dando forças para concluir essa jornada.*

*Não há nada como o sonho  
para criar o futuro. Utopia hoje,  
carne e osso amanhã.*

*Victor Hugo*

## RESUMO

*Apesar da infecção por HPV em homens estar associada a baixa morbidade e mortalidade, seu estudo é relevante, devido à sua associação com o câncer ano-genital e com as verrugas genitais, e ao papel que o homem desempenha na transmissão do HPV às suas parceiras sexuais. Neste trabalho, a carga viral e a integração do HPV-16 ao genoma humano foram avaliadas por PCR em tempo-real, em 100 amostras penianas de indivíduos com condiloma acuminado ou assintomáticos, parceiros de mulheres com lesão de alto grau. Esses parâmetros foram também estudados em 9 amostras de carcinoma peniano. As amostras foram genotipadas para detecção daquelas infectadas por HPV-16 (38%). A maioria dos homens infectados pelo HPV-16 (90%) apresentou o genoma viral com algum grau de integração, assim como todas as amostras de carcinoma peniano estudadas, sugerindo que a integração pode constituir um fator importante para a carcinogênese peniana. A integração do genoma do HPV-16 parece não ser influenciada pela presença de condiloma acuminado ou de múltiplas infecções. Ampla variação de carga viral do HPV-16 foi encontrada (0,0003 a 5.386,15 cópias/célula), independente do estado físico do genoma deste vírus, seja ele integrado ou episossomal. A integração do genoma do HPV-16 ocorreu na presença de cargas virais baixas ou elevadas (0,22 a 11,82 cópias/ célula), seja em homens com condiloma acuminado ou assintomáticos. Foi observada uma tendência de redução na carga viral com o tratamento de condiloma acuminado. Carga viral elevada não se correlacionou com maior frequência de recidivas e nem com resistência ao tratamento com podofilina. Diferença estatística foi encontrada ao se comparar a carga viral de amostras de esfregaço peniano com HPV-16 integrado e carga viral das amostras de carcinoma peniano (0,22 vs 13,29 cópias/célula,  $p=0,012$ ). Este estudo é pioneiro na investigação da carga viral e do estado físico do DNA do HPV-16 em amostras penianas não neoplásicas.*

**Palavras-chaves:** *PCR em tempo real, carga viral, estado físico DNA, homens, carcinoma peniano, condiloma acuminado.*

## ABSTRACT

*Although HPV infection in men is associated with low morbidity and mortality, the importance of its investigation should be highlighted due to association with anogenital cancer and genital warts, and the role that man plays in the transmission of HPV to their sexual partners. In this study we evaluated the viral load and integration of HPV-16 into the human genome in a hundred penile samples of men with condyloma acuminata or asymptomatic, but partners of women with high-grade lesion. These parameters were also studied in 9 penile carcinoma samples. HPV-16 genome was detected in 38% of penile samples analyzed. In majority of the infected men for this virus (90%), the HPV-16 genome presented with some degree of integration, as well as all the samples studied penile carcinoma, suggesting that integration can be an important factor for penile carcinogenesis. The integration of the HPV-16 genome does not appear, however, to be influenced by the presence of condyloma acuminata or multiple infections. Wide variation in viral load of HPV-16 was found (0.0003 a 5386.15 copies/ cell), independent of the physical state of the genome of this virus, whether integrated or episomal. The integration of the HPV-16 genome occurred in the presence of low or high viral load (from 0.22 to 11.82 copies / cell) or condylomata acuminata in men with or without symptoms. Observed any tendency of reduction in viral load with treatment of condylomata acuminata. High viral load did not correlate with increased frequency of relapses and no resistance to treatment with podophyllin. Statistical difference was found when comparing the viral load samples of penile with integrated HPV-16-DNA and samples of penile carcinoma (13.29 vs. 0.22 copies / cell,  $p = 0.012$ ). This study is pioneer in the investigation of viral load and physical state of HPV-16-DNA in penile non-neoplastic samples.*

**Keywords:** *real-time PCR, viral load, physical state of DNA-HPV, men, penile cancer, condyloma acuminata.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Representação do genoma viral do HPV-16 e suas funções.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 17 |
| <b>Figura 2</b> – Representação do processo de infecção, manutenção viral, amplificação genômica e formação de novos vírus (ciclo produtivo). As setas representam o momento onde os respectivos genes estão sendo expressos e a associação ao ciclo celular dos queratinócitos infectados e seu grau de maturação. Retirado de Doobar (2005) – Modificado.....                                                                    | 23 |
| <b>Figura 3</b> – Infecção e instabilidade genômica promovida pelo HPV (passos 1, 2 e 3). Transição entre os estados físicos episomal (1), misto (2 e 3) e integrado (4). Instalação do ciclo incompleto do HPV (4). Influência de múltiplas infecções sobre o processo de instabilidade genômica. Retirado de Kadaja et al. (2007) – Modificado.....                                                                              | 24 |
| <b>Figura 4</b> – Evolução da infecção viral. As setas representam o momento onde a expressão dos respectivos genes ocorre, culminando com a produção de novos vírus (ciclo produtivo). Posteriormente o ciclo produtivo incompleto se instala pelo processo de integração. Observa-se a associação com a evolução de lesões. Retirado de Doobar (2005).....                                                                       | 25 |
| <b>Figura 5</b> - Representação da evolução de lesões até a instalação do câncer. Lesões persistentes estão associadas a lesões mais graves e constituem um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer. Retirado de Crow (2012).....                                                                                                                                                                               | 26 |
| <b>Figura 6</b> - Fluxograma descrevendo a população estudada e a metodologia usada na investigação da carga viral e do estado físico do genoma do HPV-16.....                                                                                                                                                                                                                                                                     | 51 |
| <b>Figura 7</b> - Fluxograma descrevendo a metodologia de coleta e as coletas sequenciais previstas usadas na investigação da carga viral e do estado físico do genoma do HPV-16.....                                                                                                                                                                                                                                              | 52 |
| <b>Figura 8</b> - Eletroforese em gel de poliacrilamida de experimento de avaliação do plasmídeo pE6 obtido. 1ª. Canaleta: padrão de peso molecular 100 pb, Invitrogen; 2ª. Canaleta: amostra cervical conhecida (infectada por HPV-16 episomal); 3ª. Canaleta: SiHa (amostra de fibroblasto humano infectado por HPV-16, forma integrada); 4ª. Canaleta: pGEM, 5ª. Canaleta: pE6, 6ª. Canaleta: pHPV16; 7ª. Canaleta: Branco..... | 61 |
| <b>Figura 9</b> - Gráficos representativos das padronizações das PCRs em tempo real para os genes endógenos $\beta$ -actina (A) e GAPDH (B). Gráficos obtidos durante o teste de concentração dos primers.....                                                                                                                                                                                                                     | 62 |

- Figura 10** - Curva de amplificação: Gráfico obtido pela plotação dos valores de ciclo de PCR vs fluorescência. Cada curva sigmóide representa uma amostra da curva padrão e suas replicas.  $\beta$ -actina (A) –Curva padrão 102 a  $10^{-2}$  ng de DNA total, gene E6 (B) e gene E2 região de dobradiça (C) e amino terminal (D). Nestes últimos três gráficos, a curva padrão foi construída nas concentrações de  $10^7$  a 10 cópias dos genes, E6 e E2..... 63
- Figura 11** - Curva padrão: Construída a partir da curva de amplificação. Determinado o threshold, associa-se o ciclo threshold encontrado com a respectiva quantidade e constrói-se a curva padrão abaixo por regressão linear dos pontos obtidos. Gráfico quantidade vs CT (ciclo threshold). Cada ponto vermelho representa uma amostra da curva padrão assim obtida.  $\beta$ -actina (A), gene E6 (B) e gene E2 região de dobradiça (C) e amino terminal (D)..... 63
- Figura 12** - Curva melt:derivação repórter x temperatura.Curva obtida para controle de qualidade da reação. A existência de um único pico garante ausência de bandas inespecíficas e o branco sem picos garante a ausência de dímeros de primer.  $\beta$ -actina (A), gene E6 (B) e gene E2 região de dobradiça (C) e amino terminal (D)..... 64
- Figura 13** - Amostras de géis de poliacrilamida corados pela prata, apresentando resultados de diferentes PCRs..... 69
- Figura 14** - Valores logarítmicos de carga viral dos pacientes infectados por mais de um tipo viral (múltiplas infecções), somente pelo HPV-16 (A), com ou sem condiloma acuminado (B) e das amostras de câncer peniano. As linhas horizontais indicam os valores de mediana das amostras analisadas..... 73
- Figura 15** - Valores logarítmicos de carga viral dos amostras penianas categorizadas quanto ao estado físico do DNA-HPV-16 como integradas, mistas e epissomais e das amostras de câncer peniano onde o HPV-16 encontra-se integrado. As linhas horizontais indicam os valores de mediana das amostras analisadas..... 75
- Figura 16** - Valores logarítmicos de carga viral do HPV-16 dos pacientes com condiloma acuminado recidivantes e não recidivantes (A) e dos resistentes ou não ao tratamento com podofilina (B). As linhas horizontais indicam os valores de mediana das amostras analisadas..... 78

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1-</b> <i>Características da infecção genital por HPV em homens.....</i>                                          | 30 |
| <b>Quadro 2-</b> <i>Carga viral do HPV em lesões do trato genital masculino.....</i>                                        | 44 |
| <b>Quadro 3-</b> <i>Estado físico do DNA-HPV-16 em lesões do trato genital masculino.....</i>                               | 49 |
| <b>Quadro 4-</b> <i>Seqüência de bases dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.....</i>                         | 53 |
| <b>Quadro 5 –</b> <i>Reagentes utilizados no preparo de 10 µL de reação de PCR....</i>                                      | 54 |
| <b>Quadro 6 –</b> <i>Condições das reações de PCR.....</i>                                                                  | 55 |
| <b>Quadro 7 –</b> <i>Reagentes utilizados no preparo de 5 µL de reação de ligação para construção do plasmídeo pE6.....</i> | 56 |
| <b>Quadro 8 –</b> <i>Iniciadores testados na padronização da PCR em tempo real....</i>                                      | 58 |
| <b>Quadro 9 -</b> <i>Amostras utilizadas na categorização da relação E2/E6.....</i>                                         | 60 |
| <b>Quadro 10 -</b> <i>Reagentes utilizados no preparo de 10 µL de reação de PCR...</i>                                      | 62 |
| <b>Quadro 11 -</b> <i>Condições das reações de PCR.....</i>                                                                 | 62 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> – <i>Valores individuais razão E2/E6 nas diferentes concentrações utilizadas para a categorização do estado físico HPV-16.....</i>                                        | 65 |
| <b>Tabela 2</b> – <i>Amostras preparadas e utilizadas na categorização da relação E2/E6 e valores dessa relação determinados experimentalmente.....</i>                                   | 65 |
| <b>Tabela 3</b> – <i>Valores de carga viral em cópias/célula e estado físico do DNA-HPV-16 das amostras de câncer peniano.....</i>                                                        | 66 |
| <b>Tabela 4</b> – <i>Prevalência da infecção por HPV nas 100 amostras analisadas..</i>                                                                                                    | 67 |
| <b>Tabela 5</b> – <i>HPVs identificados em múltiplas infecções.....</i>                                                                                                                   | 68 |
| <b>Tabela 6</b> – <i>Frequência da infecção por HPV em amostras penianas detectada por PCR e associação com os dados clínicos-epidemiológicos.....</i>                                    | 71 |
| <b>Tabela 7</b> – <i>Valores de carga viral do HPV-16 (cópias/célula) nas amostras analisadas e sua variação em relação à parametros epidemiologicos dos participantes do estudo.....</i> | 72 |
| <b>Tabela 8</b> – <i>Estado físico DNA-HPV-16 e valores de carga viral (cópias/célula) de acordo com variáveis epidemiológicas dos participantes do estudo.....</i>                       | 74 |
| <b>Tabela 9</b> – <i>Carga viral das amostras neoplásicas e não neoplásicas, categorizadas de acordo com o estado físico do DNA-HPV-16.....</i>                                           | 76 |
| <b>Tabela 10</b> – <i>Recidiva de condiloma acuminado, carga viral e estado físico DNA-HPV-16.....</i>                                                                                    | 77 |
| <b>Tabela 11</b> – <i>Resistência ao tratamento com podofilina de condiloma acuminado, carga viral e estado físico do DNA-HPV-16.....</i>                                                 | 78 |
| <b>Tabela 12</b> – <i>Informações sobre o retorno dos pacientes para as coletas sucessivas.....</i>                                                                                       | 80 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*ATP – adenosina trifosfato*

*CTDST – Centro de treinamento em doenças sexualmente transmissíveis*

*DNA – ácido desoxirribonucleico*

*DST – doença sexualmente transmissível*

*E – early (gene precoce)*

*EGFR – receptor do fator de crescimento epidérmico*

*EGF - fator de crescimento epidérmico*

*ER $\alpha$  – receptor para estrógeno  $\alpha$*

*GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase*

*HC – captura híbrida*

*HIV – vírus da imunodeficiência humana*

*HPV – Papilomavírus humano*

*HR – fator de risco*

*IFR – fator regulatório do interferon*

*L – late (gene tardio)*

*LB – meio de cultura Luria- Bertani*

*LCR – long control region (região de controle longa)*

*MME - minichromosome maintenance element (elemento de manutenção minicromossomal)*

*mRNA – ácido ribonucleico mensageiro*

*n – número amostral*

*NIA – neoplasia intraepitelial anal*

*NIC – neoplasia intraepitelial cervical*

*NIP – neoplasia intraepitelial peniana*

*NUPAD – Núcleo de ações e pesquisa em apoio diagnóstico*

*OR – odds ratio*

*ORI - origem de replicação*

*ORF – open reading frame (janela de leitura)*

*pb – pares de base*

*PCR – reação em cadeia de polimerase*

*PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas*

*pRB – proteína do retinoblastoma*

*PV - papilomavírus*

*qsp – quantidade suficiente para*

*S – fase de síntese do ciclo celular*

*TGF- $\beta$  – fator de transformação do crescimento  $\beta$*

*TLR – receptor toll-like*

*UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais*

*URR - upstream regulatory region (região reguladora a montante)*

*vs – versus*

## SUMÁRIO

|                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                         | 15  |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA.....                                                                              | 17  |
| 2.1. Papilomavirus humano (HPV).....                                                                       | 17  |
| 2.2. Ciclo biológico do HPV.....                                                                           | 22  |
| 2.3. Prevalência da infecção genital por HPV em homens.....                                                | 27  |
| 2.4. Fatores de risco da infecção por HPV.....                                                             | 31  |
| 2.5. Lesões associadas à infecção por HPV no homem.....                                                    | 32  |
| 2.5.1. Condiloma acuminado.....                                                                            | 34  |
| 2.5.2. Neoplasias intraepiteliais penianas.....                                                            | 36  |
| 2.5.3. Câncer peniano.....                                                                                 | 36  |
| 2.6. Carga viral e estado físico do DNA-HPV.....                                                           | 38  |
| 2.6.1. Carga Viral.....                                                                                    | 38  |
| 2.6.2. Estado Físico do DNA-HPV.....                                                                       | 46  |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                 | 50  |
| 3.1. População estudada.....                                                                               | 50  |
| 3.2. Coleta do material.....                                                                               | 51  |
| 3.3. Análise molecular.....                                                                                | 52  |
| 3.3.1. Identificação e tipagem do HPV.....                                                                 | 52  |
| 3.3.2. Plasmídeos pE6, pHPV16 e célula SiHa.....                                                           | 55  |
| 3.3.3. Determinação da carga viral.....                                                                    | 56  |
| 3.3.4. Determinação da razão E2/E6.....                                                                    | 59  |
| 3.4. Análise estatística.....                                                                              | 60  |
| 4. RESULTADOS.....                                                                                         | 61  |
| 4.1. Construção do plasmídeo E6.....                                                                       | 61  |
| 4.2. Padronização dos métodos de PCR em tempo real.....                                                    | 61  |
| 4.3. Determinação da relação E2/E6.....                                                                    | 65  |
| 4.4. Determinação da carga viral e do estado físico do genoma do HPV-16 em amostras de câncer peniano..... | 66  |
| 4.5. Prevalência da infecção por HPV.....                                                                  | 66  |
| 4.6. Dados clínicos e epidemiológicos e sua correlação com a infecção por HPV.....                         | 70  |
| 4.7. Determinação da carga viral.....                                                                      | 72  |
| 4.8. Estado físico do DNA-HPV-16.....                                                                      | 74  |
| 4.9. Carga viral, estado físico e recidiva de condiloma.....                                               | 76  |
| 4.10. Evolução da carga viral e estado físico do DNA-HPV-16.....                                           | 78  |
| 5. DISCUSSÃO.....                                                                                          | 82  |
| 6. CONCLUSÕES.....                                                                                         | 91  |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                            | 92  |
| ANEXO 1 – Aprovação COEP UFMG.....                                                                         | 103 |
| ANEXO 2 – Aprovação COEP Prefeitura Municipal de Belo Horizonte.....                                       | 104 |
| APÊNDICE 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido.....                                               | 105 |
| APÊNDICE 2 – Questionário de dados epidemiológicos.....                                                    | 107 |
| APÊNDICE 3 – Questionário de dados epidemiológicos - Retorno.....                                          | 109 |

## 1 INTRODUÇÃO

*A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é, atualmente, uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns, sendo altamente prevalente em homens e é em sua maioria assintomática (ANIC & GIULIANO, 2011). No entanto, quando as manifestações clínicas se fazem presentes, estas variam desde lesões benignas, como o condiloma acuminado, até lesões graves, como o câncer (CHOW et al., 2010).*

*Existe grande número de estudos relacionados à infecção por HPV na população feminina, diferentemente do que se observa em relação à população masculina, o que dificulta a compreensão da epidemiologia da infecção por HPV e suas manifestações clínicas nesse segmento da população.*

*Apesar da infecção por HPV no homem estar associada à baixa morbidade e mortalidade, seu estudo não pode ser considerado de menor importância, devido à sua associação com o câncer ano-genital e com as verrugas genitais, e ainda pelo papel que o homem desempenha na transmissão do HPV às suas parceiras sexuais.*

*Em estudo prévio, nosso grupo de pesquisa detectou a prevalência de DNA-HPV em parceiros sexuais de mulheres infectadas por este vírus. Pelo menos um tipo de HPV foi detectado em 86% dos parceiros e mais de um tipo viral (múltiplas infecções), seja de alto ou baixo risco, foi identificado em 39,5% das amostras. O HPV-16 foi o mais prevalente, sendo detectado em 34,9% das amostras penianas (de LIMA ROCHA et al., 2012).*

*O papel da carga viral e da integração do DNA-HPV tem sido pouco investigado em amostras penianas. A carga viral do HPV tem sido mais investigada em amostras ano-retais de homens HIV (vírus da imunodeficiência humana) positivos, os quais, frequentemente, apresentam alta carga viral (ALVAREZ et al, 2010; SALIT et al., 2009), o que tem sido associado com persistência da infecção e progressão de lesões nestes homens (ALVAREZ et al, 2010; BLEEKER et al., 2006; SALIT et al., 2009). Entretanto, Ball et al. (2011) relatam que baixa carga viral em verrugas genitais podem produzir elevados níveis de mRNA de proteínas oncogênicas como os observados na presença de altas cargas virais. Portanto, não existe consenso no papel que a*

*carga viral pode desempenhar no processo de integração e na progressão de lesão peniana. Além disso, são escassos os dados relacionados com o estado físico do DNA-HPV-16 em lesões anogenitais ou em amostras de câncer peniano (DO et al., 2013; KALANTARI et al., 2008; TORNESELLO et al., 1997).*

*Considerando a escassez de informação e a importância desta infecção na população masculina, são necessários estudos que abordem seus diferentes aspectos, visando uma melhor compreensão do papel dos homens na transmissão e manutenção desta infecção, além do melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de lesões neoplásicas.*

*Este trabalho teve, portanto, como objetivo geral: Avaliar a carga viral e o estado físico do genoma do HPV-16 (se integrado ou epissomal) em amostras penianas de homens infectados por HPV e relacionar com o câncer peniano, com a presença de condiloma acuminado, múltiplas infecções, recidiva e eficácia de tratamento.*

*E como objetivos específicos:*

- 1. Determinar a carga viral do HPV-16 em homens atendidos em uma clínica de DST;*
- 2. Determinar a evolução da carga viral em pacientes submetidos a mais de uma coleta, correlacionado com a recidiva e o tratamento do condiloma acuminado;*
- 3. Avaliar o estado físico (epissomal ou integrado) do genoma do HPV-16;*
- 4. Correlacionar a carga viral e o estado físico do HPV-16 observado nas amostras penianas do presente estudo com estes parâmetros em amostras de carcinoma peniano;*
- 5. Correlacionar a carga viral e o estado físico do HPV-16 com a presença de co-infecção por outros tipos virais e presença de condiloma.*

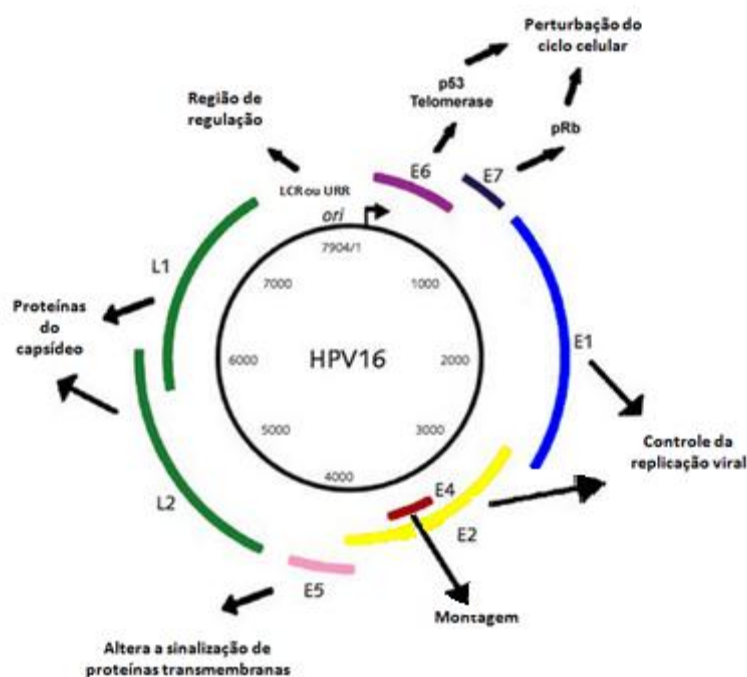
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Papilomavírus humano (HPV)

O HPV é um vírus DNA fita dupla, não envelopado, que mede aproximadamente 55 nanômetros de diâmetro. Está associado a infecções em pele e mucosas e tem predileção pelas células da camada basal do epitélio estratificado escamoso e por células metaplásicas e de reserva existentes em junções escamo-colunares. A maioria das infecções promovidas por este vírus é assintomática. No entanto, quando manifestações clínicas se fazem presentes, estas variam desde lesões benignas, como o condiloma acuminado, até lesões graves como o câncer (CHOW et al., 2010).

Seu genoma possui aproximadamente 8000 pares de bases, podendo ser dividido em três regiões funcionais: a região conhecida como long control region (LCR, região de controle longa) ou também denominada de upstream regulatory region (URR, região reguladora a montante), os genes early (E, precoces) e os genes late (L, tardios) (CHOW et al., 2010)(Fig.1).

Figura 1



Representação do genoma viral do HPV-16 e suas funções

*A região LCR consiste em uma região não codificadora constituída por um segmento de DNA de 900 pares de base (pb) que contém a origem de replicação (ORI) viral e os elementos de controle transcricional, os quais regulam a expressão gênica do HPV (DOOBAR et al., 2012).*

*Os genes tardios, L1 e L2, codificam as 72 subunidades proteicas do capsídeo viral, de formato icosaédrico. O gene L1 é considerado como a região mais conservada do genoma do HPV. As proteínas oriundas destes genes são estruturalmente semelhantes, são expressas nas camadas superiores do epitélio e suas expressões são dependentes da atuação de genes de diferenciação (DOOBAR et al., 2012).*

*Os genes precoces E1 e E2 são responsáveis, respectivamente, pela replicação do DNA viral e controle da transcrição dos demais genes, estando envolvidos na proliferação viral.*

*A proteína E1, uma fosfoproteína de 70 a 80 Kda - ATP dependente, possui tanto atividade de ATPase quanto de helicase. Forma um dímero com E2 e posteriormente, este dímero forma um tetrâmero, que se liga em regiões ricas em adenina-timina da região LCR, direcionando fatores de transcrição do hospedeiro para a origem de replicação viral. E1 sozinha, embora pouco específica, é capaz de ativar a transcrição “in vitro”, mas não o faz “in vivo” sendo necessária a presença de E2 (KADAJA et al., 2009).*

*Segundo trabalho de revisão de Kadaja et al. (2009), a primeira replicação é rápida e transiente. Depois que o DNA viral se estabiliza, este se mantém em número constante de cópias durante subseqüentes divisões celulares basais. Esta manutenção pode se dar de dois modos diferentes: 1) o genoma viral dobra durante a fase de síntese (S) e segrega de forma igual nas células filhas ou 2) o DNA viral pode-se replicar randomicamente, isto é, haverá vírus que se replicarão todas as vezes que a célula entrar na fase S, outros apenas uma única vez, outros não replicarão. Para que o primeiro modo de manutenção viral aconteça, a maquinaria de replicação celular deve controlar e ativar a origem de replicação viral; já para o segundo, a origem de replicação viral não é rigidamente controlada e regulada pela maquinaria do hospedeiro. Acredita-se que o modo de manutenção escolhido dependerá do tipo celular infectado e*

é dependente do nível de expressão de E1. Altas concentrações de E1 favorecem a manutenção randômica.

E2, por sua vez, atua como regulador da transcrição. Ativador quando ligado a E1 e repressor quando nas formas E2C e E2/E8. O primeiro é um transcrito obtido a partir de um promotor interno à janela de leitura de E2 e o segundo criado por “splicing”. Na ausência destas formas repressoras a replicação é 10-20 vezes maior (KADAJA et al., 2009). E2 também se liga a uma região denominada de MME (minichromosome maintenance element), localizada na região de LCR, e, por intermédio desta, ancora o DNA episossomal aos cromossomos do hospedeiro ou ao eixo mitótico, sendo assim responsável pela segregação viral durante a divisão celular (KADAJA et al., 2009).

E1 e E2 são essenciais para a estabilização do DNA viral em longo prazo. Os níveis de E1 juntamente com os de E6 e E7 criam um meio ambiente celular propício para a manutenção da forma episossomal (KADAJA et al., 2009).

O gene E4 codifica uma proteína associada à maturação viral e à alteração da matriz intracelular. E4 se associa com ceratinas do citoesqueleto da célula hospedeira, facilitando a montagem e maturação do vírus. E4 é expressa nas camadas diferenciadas do epitélio, em estágios tardios da infecção e tem sido co-localizada com a proteína L1 (DOOBAR et al., 2012).

A região de E5 codifica uma proteína hidrofóbica, preferencialmente encontrada no complexo de Golgi, no retículo endoplasmático e na membrana nuclear das células infectadas. Quando presente, a proteína E5 é capaz de interagir com várias proteínas transmembranosas como os receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), entre outros. A presença de E5 parece estimular o EGFR na presença de seu ligante. Age conjuntamente com a proteína E7, possuindo, então, função sinérgica ao fator de crescimento epidérmico (EGF), estimulando a proliferação celular e impedindo a apoptose (CAI et al., 2012; YUAN et al., 2012).

Células normais do epitélio escamoso estratificado param de se reproduzir à medida que começam a se diferenciar, um problema para o HPV, que precisa da DNA polimerase e dos fatores de transcrição que são apenas produzidos durante a divisão celular. Esse problema é resolvido pela atuação das oncoproteínas E6 e E7. Os genes E6 e E7 codificam proteínas que podem

estimular a proliferação e a transformação das células hospedeiras, cooperando sinergicamente para a imortalização celular. A oncoproteína E7 é uma pequena fosfoproteína com aproximadamente 100 aminoácidos que se liga de forma eficiente à proteína do retinoblastoma (pRB) em seu sítio de ligação de fatores de transcrição, como membros da família E2F. Esta interação leva à liberação do fator de transcrição E2F do complexo repressor transcricional pRB/E2F, permitindo a estimulação da proliferação celular. E7 também é capaz de associar-se a outras proteínas envolvidas na proliferação celular, incluindo inibidores de Cdkp21 e p27, histonas desacetilases e componentes do complexo de transcrição AP-1 (DOORBAR et al., 2012; NGUYEN & MÜNGER, 2009; YUAN et al., 2012). E7 também pode imortalizar células por desregular mecanismos de apoptose por interação com p107, p130 e p600 e por modulação do TGF- $\beta$  (fator de transformação do crescimento  $\beta$ ), um potente inibidor do crescimento celular (NGUYEN & MÜNGER, 2009).

A proteína E6 complementa o papel desempenhado por E7, evitando a indução de apoptose em resposta à proliferação celular mediada por E7 (DOORBAR et al., 2012; HOWIE et al., 2009). Esta oncoproteína é capaz de se associar à proteína p53 via outra proteína celular, a proteína associada à E6 (E6-AP) e também à E3 ubiquitina ligase, resultando na ubiquitinação de p53 e subsequente degradação proteolítica. Outras vias de inativação de p53 constituem-se no sequestro da mesma no citoplasma pela proteína E6 viral e a interação com CBP/p300 ou hADA3 histona acetiltransferase (HOWIE et al., 2009). Estes efeitos anulam a ativação transcricional e as propriedades de p53 e interrompe sua habilidade de bloquear o ciclo celular e de induzir a apoptose. E6 também media a degradação de proteínas pro-apoptóticas, como Bak, e ativa a telomerase da célula hospedeira, além de modular vias de sinalização da proteína G e vias de reconhecimento imunes, como fator 3 interferon regulador (IFR-3) e receptor toll-like 9 (TLR-9) (DOORBAR et al., 2012; HOWIE et al., 2009, YUAN et al., 2012).

A expressão e atuação das proteínas oncogênicas do HPV são necessárias para o surgimento de lesões cervicais. Mutações adicionais geradas a partir da instabilidade genômica provocada pelas oncoproteínas são necessárias para a progressão maligna (NGUYEN & MÜNGER, 2009; HOWIE et al., 2009).

Os diferentes tipos de Papilomavírus (PV) são classificados pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus como pertencentes à família Papillomaviridae, composta de 29 gêneros e 189 tipos diferentes de PVs. Destes, 120 infectam humanos, 64 outros mamíferos, 3 infectam aves e 2 répteis (BERNARD et al., 2010).

Estes vírus são agrupados de acordo com a homologia das sequências de nucleotídeos na região L1. Os gêneros são identificados através de letras do alfabeto grego e possuem menos de 60% de homologia entre os genes. As espécies de PV possuem entre 60-70% de homologia entre as sequências, enquanto que os tipos de PV compartilham entre 71%-89% de sequência de nucleotídeos idênticos. Tipos de PV são identificados por números na sequência histórica de sua descrição, como por exemplo, PV-1 e PV-2. Subtipos de PV diferem entre 2% a 10% e as variantes de PV diferem em menos de 2% da sequência gênica (BERNARD et al., 2010; de VILLIERS et al., 2004).

Dos vírus que infectam humanos, o gênero clinicamente mais importante é referido como alfa-papilomavírus. Cerca de 40 tipos podem causar infecções ano-genitais, os quais podem ser classificados em grupos de alto risco ou carcinogênico (HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), possivelmente carcinogênico (26, 30, 53, 66, 67, 68, 69, 70, 82, 85) e baixo risco ou não carcinogênico (HPVs 2, 6, 7, 11, 13, 27, 28, 29, 32, 40, 44, 57, 61, 62, 72, 74, 77, 81, 83, 84, 86, 87, 89, 90, 91, 106), de acordo com a possibilidade de induzir o desenvolvimento de lesões malignas (DOOBAR et al., 2012; de VILLIERS et al., 2004). Essa força para indução ao câncer pode ser explicada pela forma como as oncoproteínas, dos diferentes tipos virais atuam. Em trabalho de revisão, Doobar et al. (2012) reuniram estudos que mostraram diferenças significativas no posicionamento e na regulação do promotor entre os vírus de alto e baixo risco, bem como nos padrões de “splicing” de mRNA. Essas diferenças alteram a expressão dos genes E6 e E7, afetando assim a gravidade da lesão e suas chances de progressão.

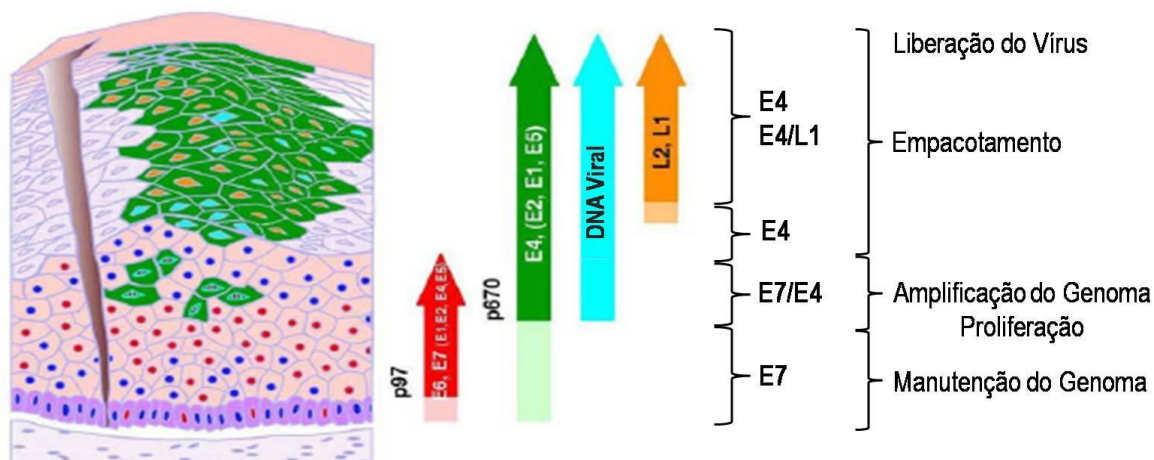
## 2.2 Ciclo biológico do HPV

*A internalização do vírus é um processo lento e complexo que pode durar horas e que parece ocorrer via endocitose, por vesículas cobertas por clatrina (ABBAN et al., 2008; LANIOSZ et al., 2009), embora isto seja controverso (SCHELHAAS et al., 2012). O desnudamento do vírus, no interior da célula, permite que o DNA viral seja transportado para o núcleo.*

*Após sua entrada, o vírus se direciona ao núcleo celular e lá inicia o processo de estabilização. Estudos em mulheres infectadas relatam que o baixo número de cópias virais (10-200 cópias por célula), nas células basais, favorece a manutenção da forma epissomal, a qual é garantida também pela atuação dos genes E1 e E2 (DOORBAR, 2005; KADAJA et al., 2009; PEITSARO et al., 2002). Sob a forma epissomal, ocorre a fase proliferativa da infecção, onde partículas virais são formadas independentemente do ciclo de divisão celular, embora vinculadas à sua maturação, sendo a formação dos virions concluída nas camadas superiores do epitélio. O evento responsável pela ativação da replicação viral, retirando o vírus de sua fase de manutenção e fazendo-o entrar na fase proliferativa, ainda não é conhecido. Durante a proliferação, há um aumento da expressão dos genes tardios e manutenção da expressão de E6 e E7. O aumento na expressão de E1 e E2 é necessário para o aumento do número de cópias virais (DOOBAR et al., 2012) (Fig.2). A infecção pelo HPV promove um ciclo não citolítico. Portanto, o vírus deve sair de dentro da célula e sobreviver no meio extracelular para uma próxima infecção.*

*Quando o nível intracelular de E1, proteína que facilita o início da replicação viral, é alto, replicações aberrantes começam a ocorrer (replicação “onion-skin”, Fig.3, passo 1) e geram um conjunto complexo de fragmentos do genoma do vírus que são ativamente modificados, recombinados e degradados pela maquinaria celular do hospedeiro. A quantidade de fragmentos subgenômicos depende da concentração de proteína E1. Portanto, a replicação muito intensa do DNA viral proporciona níveis elevados de E1, podendo ameaçar a estabilidade do genoma viral, fazendo-o integrar (MÄNNIK et al., 2002).*

Figura 2



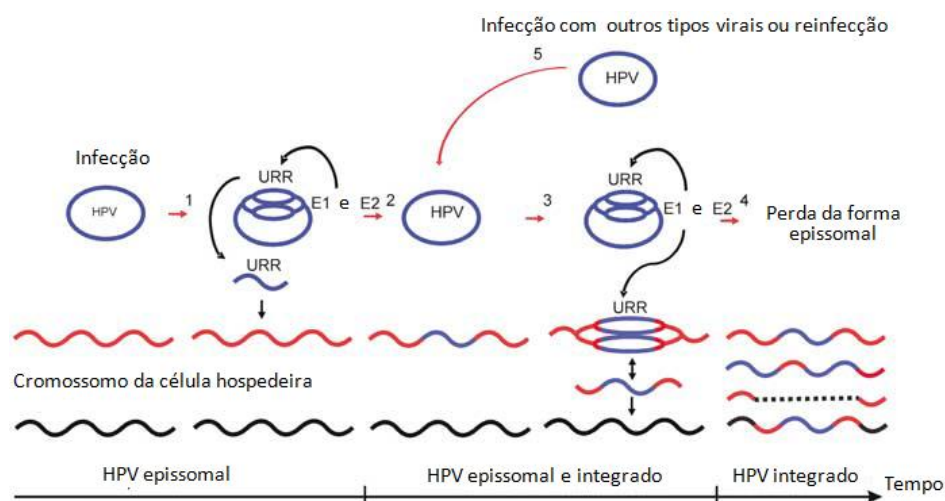
Representação do processo de infecção, manutenção viral, amplificação genômica e formação de novos vírus (ciclo produtivo). As setas representam o momento onde os respectivos genes estão sendo expressos e a associação ao ciclo celular dos queratinócitos infectados e seu grau de maturação. Modificado de Doobar (2005).

Durante o processo de integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro (Fig.3, passo 1 e 2), os genes E2 ou E1 são quebrados, perdendo assim sua funcionalidade (DOOBAR et al., 2012). Como consequência, perde-se também o controle na expressão dos genes oncogênicos E6 e E7 e a estabilidade da forma epissomal.

Existem evidências que o processo de integração é gradativo, havendo coexistência entre as formas epissomais e integradas (forma mista). (Fig.3, passo 2 e 3). Kadaja et al. (2007) investigaram o papel da expressão concomitante de genes epissomais e integrados, o que se assemelha à infecção mista, sob o genoma viral, de uma forma bastante elegante. Plasmídeos expressando E1 e E2 foram usados para transfectar células SiHa e HeLa, as quais contêm, respectivamente, os genomas integrados dos HPVs 16 e 18. Os resultados levaram os autores a propor o modelo ilustrado na figura 3. O genoma do HPV integrado permanece ativo e disponível à replicação e transcrição, sendo controlado pelas proteínas E1 e E2 produzidas pela forma epissomal. O material genético assim duplicado conterá o genoma do HPV

integrado, como também regiões flanqueadoras, pertencentes ao genoma do hospedeiro, gerando um intermediário replicativo, contendo várias cópias, mas ainda ligado ao genoma da célula hospedeira (replicação “onion-skin”). Esse genoma amplificado será novamente integrado ao genoma do hospedeiro, aumentando assim o número de cópias virais, um processo que envolve formação “de novo” (Fig.3, passo 3). O aumento do número de cópias do HPV integrado promove um aumento da quantidade das proteínas E6 e E7 disponíveis, promovendo instabilidade genômica. A atuação das proteínas oncogênicas, conjuntamente com as várias integrações virais “de novo”, as quais promovem ganhos e perda de função de genes do hospedeiro, favorecem o processo de carcinogênese. Reinfecções, causadas por tipos diferentes de HPV, ou mesmo pelo mesmo tipo viral, podem mimetizar o que ocorre na forma mista da infecção, contribuindo também para aumentar o estado de instabilidade genômica celular (Fig.3, passo 5) (KADAJA et al., 2007). Com a integração total das formas episossomais (Fig.3, passo 4), a replicação viral fica limitada à multiplicação celular, estabelecendo um ciclo produtivo incompleto (ciclo abortivo), em que partículas virais não chegam a ser formadas (DOOBAR, 2005).

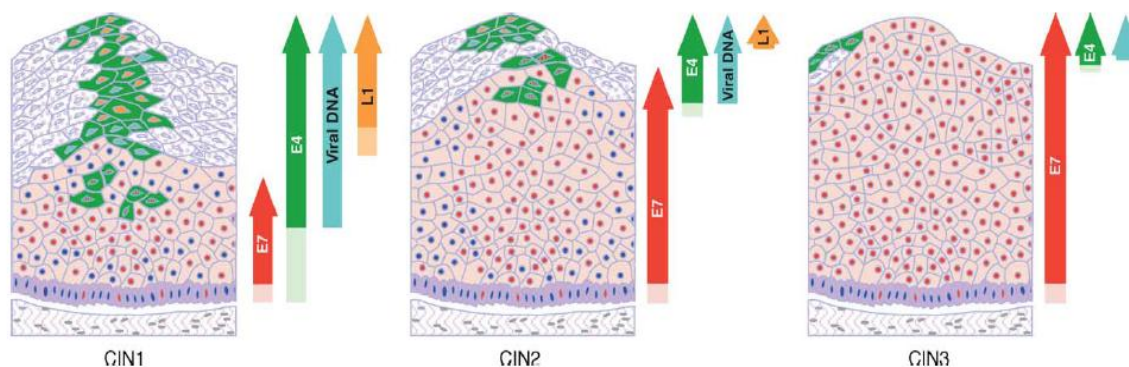
**Figura 3**



Infecção e instabilidade genômica promovida pelo HPV (passos 1, 2 e 3). Transição entre os estados físicos episossomal (1), misto (2 e 3) e integrado (4). Instalação do ciclo incompleto do HPV (4). Influência de múltiplas infecções sobre o processo de instabilidade genômica. URR = upstream regulatory region (região reguladora a montante). Modificado de Kadaja et al. (2007).

A integração pode, por isso, se tornar um possível marcador de progressão neoplásica (ARIAS-PULIDO et al., 2006). Nesse sentido, observa-se que, quanto maior o grau da lesão, maior a frequência de integração, maior expressão de E6 e E7 e menor a carga viral (DOOBAR, 2005) (Fig.4).

**Figura 4**

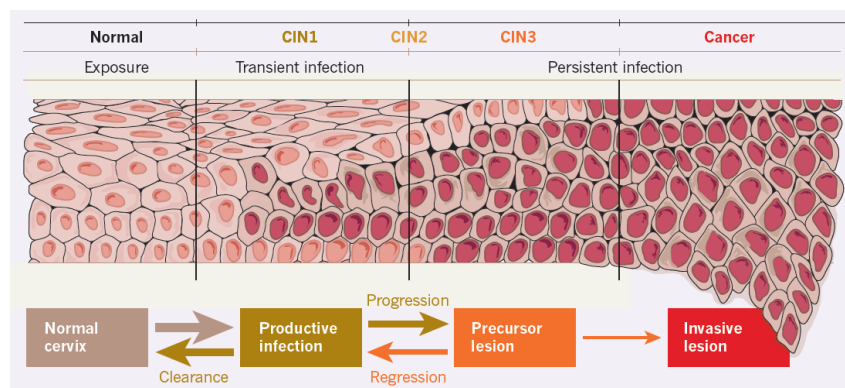


Evolução da infecção viral. As setas representam o momento onde a expressão dos respectivos genes ocorre, culminando com a produção de novos vírus (ciclo produtivo). Posteriormente o ciclo produtivo incompleto se instala provocado pelo processo de integração. Observa-se a associação com a evolução de lesões. Retirado de Doobar (2005).

Tem sido sugerido que o grande número de cópias virais aumenta a probabilidade de ocorrência deste fenômeno. Integrações podem acontecer tanto em células normais quanto em lesões pré-invasivas e invasivas (ALVAREZ et al., 2010). A infecção persistente por HPV de alto-risco pode resultar na integração do DNA viral no genoma das células do hospedeiro, que é considerada um dos principais fatores de risco no desenvolvimento de lesões cervicais e do câncer cervical (ARIAS-PULIDO et al., 2006; CHEUNG et al., 2006) (Fig.5).

A retenção intracelular dos antígenos virais pode comprometer a detecção do vírus pelo sistema imune, favorecendo assim a persistência (BRYAN & BROWN, 2001). Além disso, o HPV também possui mecanismos que limitam a apresentação de epítopos ao sistema imune, nas camadas mais baixas do epitélio (GRABOWSKA & RIEMER, 2012; HOWIE et al., 2009).

Figura 5



Representação da evolução de lesões até a instalação do câncer. Infecções persistentes estão associadas a lesões mais graves e constituem um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer. Retirado de Crow (2012).

Os mecanismos de sinalização para integração não são completamente compreendidos, mas o local de integração no genoma do hospedeiro pode ser importante para a progressão da lesão. Demonstrou-se que o HPV integra, preferencialmente, em locais frágeis do genoma do humano, ou nas proximidades de genes que controlam as funções celulares associadas à proliferação e maturação, tais como genes supressores de tumor, protooncogenes, genes envolvidos na adesão celular ou em apoptose (DALL et al., 2008; KALANTARI et al., 2008; LI et al., 2013; MATOVINA et al., 2009; SCHMITZ et al., 2012). Tais eventos de integração foram mais observados em lesões de alto grau, do que em lesões cervicais de baixo grau, o que indica que este é um acontecimento crítico na progressão do câncer (MATOVINA et al., 2009). Locais semelhantes foram observados em DNA-HPV-16 integrado em amostras de câncer peniano (DALL et al., 2008).

O ciclo de vida do HPV está intimamente ligado ao estado de diferenciação do epitélio infectado. Como faltam as enzimas necessárias para a sua duplicação, o HPV precisa dissociar os queratinócitos do seu ciclo de diferenciação celular e mantê-los competentes à replicação ou então reestabelecer um estado replicativo dentro de queratinócitos diferenciados,

sendo esta a função das oncoproteínas virais (McLAUGHLIN-DRUBIN & MÜNGER et al., 2009).

Wechsler et al. (2012) sugerem que o estabelecimento precoce da forma epissomal na camada basal do epitélio escamoso pode levar a diferentes níveis de expressão das proteínas E6 e E7, e que esta diferença pode ser determinada pelo nível de progressão da célula infectada no ciclo ao longo do epitélio e/ou pelo número de cópias virais epissômicas, provocando assim fenótipos diferentes quanto ao grau de lesão. Os mecanismos moleculares que determinam estas diferenças ainda não estão claros, mas não parecem estar ligados a mudanças no padrão de metilação do genoma viral. Os autores sugerem que células com maiores taxas de crescimento e multiplicação ou com capacidade baixa de inibição do crescimento por contato permitem a evolução para lesões de alto grau. O grau de maturação celular também estaria associado à capacidade do vírus em interferir em vias relacionadas à proliferação e maturação celular. Ressaltam, no entanto, a necessidade de mais estudos.

### **2.3 Prevalência da infecção por HPV**

A prevalência da infecção por HPV varia de acordo com a região geográfica (SMITH et al., 2011), o local de coleta, se amostra peniana, anal ou oral, ou se em único sítio ou em múltiplos, assim como o comportamento sexual, se homossexuais ou heterossexuais, se parceiros de mulheres infectadas pelo HPV, se imunossuprimidos, além do método de análise, todos estes fatores são fontes importantes que podem determinar a amplitude dessa variação (GIULIANO et al., 2008; VIDELA et al., 2013).

A prevalência do HPV na América Central e do Sul varia entre 2 a 84%, na América do Norte entre 8 a 93,2%, na Europa entre 2,2 a 78%, na Ásia entre 1,3 a 66,7 e na África entre 54 a 57,6%. Em alguns estudos, o Brasil tem sido relatado como um país que apresenta elevada prevalência de infecção por HPV, quando comparado com outros países (FRANCESCHI et al., 2002; GIULIANO et al., 2011; HPV STUDY GROUP IN MEN FROM BRAZIL, USA AND MEXICO, 2008). Em estudo realizado por Giuliano et al. (2008), 160 homens do Brasil, México e Estados Unidos foram avaliados e uma prevalência de 65,2% de infecção por HPV detectada. O Brasil foi o país que apresentou

maior prevalência de infecção por HPV (72,3%), seguido pelo México (61,9%) e Estados Unidos (61,3%).

Em revisão, Giuliano et al. (2008) relatam prevalência da infecção por HPV em 73% dos homens assintomáticos, em 90% nas neoplasias intraepiteliais penianas (NIP), em 85% dos cânceres anais e em cerca de 50% dos penianos. Nas mulheres, a presença de HPV relaciona-se com 36-40% dos casos de cânceres vulvares, 60-90% dos de vagina, anais e perianais e em 90-100% nos casos de cânceres cervicais. Nos cânceres de orofaringe, a prevalência da infecção por HPV é de 33-72% e de 10% nos cânceres de laringe (GIULIANO et al., 2008; FORMAN et al., 2012; zur HAUSEN, 2009).

Nos homens, a prevalência do HPV varia de 1,3 a 73%, sendo mais prevalente em homens com idade acima dos 30 anos e com número elevado de parceiros sexuais (28-76%) (DUNNE et al., 2006; PARTRIDGE & KOUTSKY, 2006). Segundo Giuliano et al. (2011), há 29-39% de chance de um homem se infectar por HPV no espaço de 1 ano.

Estudos mais recentes (AKOGBE et al., 2012; ANIC & GIULIANO, 2011; SMITH et al., 2011; SYRJÄNEN, 2011) têm mostrado não haver diferenças significativas na prevalência do HPV em homens de diferentes faixas etárias, diferentemente do que ocorre nas mulheres, em que se observa menor chance de infecção por este vírus em mulheres mais velhas.

Em uma revisão realizada por Smith et al. (2011), a prevalência de HPV de baixo risco em homens variou de 1 a 84%, sendo que em 70 a 100% dos casos de condiloma acuminado são detectados HPV dos tipos 6 e 11. A prevalência de HPV de alto risco encontrada foi de 2 a 93%, sendo o mais prevalente o HPV-16. Infecções causadas por múltiplos tipos virais apresentam prevalência de 2,3 a 60% (PARTRIDGE & KOUTSKY, 2006; VACCARELLA et al., 2011), sendo 20-50% destas co-infecções associadas aos vírus de alto risco (GIULIANO et al., 2008). Segundo Vaccarella et al. (2011) infecções múltiplas foram encontradas em 59,7% dos homens brasileiros.

Entre os homens que apresentam maior risco para a infecção por HPV, como aqueles atendidos em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis e que se relacionam sexualmente com mulheres infectadas pelo HPV ou com citologia anormal e os HIV positivos, a prevalência varia de 2 a 93,2% (SMITH et al., 2011). No Brasil, a prevalência do HPV em homens que se relacionam

sexualmente com mulheres que apresentam lesões intraepiteliais cervicais varia de 23 a 86% (de LIMA ROCHA et al., 2012; NICOLAU et al., 2005; ROMBALDI et al., 2006; ROSENBLATT et al., 2004).

A prevalência da infecção por HPV varia ainda de acordo com o local da coleta. Em trabalho de revisão realizado por Dunne et al. (2006), verifica-se que os índices de detecção da infecção por HPV encontrados variaram de 6,5% a 50% na coroa e glândula, de 5,6% a 51,5% no corpo peniano, 24% a 50% no prepúcio, 7,1% a 46,2% no escroto, 8,7% a 50% na uretra distal e de 0% a 32,8% no períneo, ânus e reto. Em amostras de urina, a prevalência de DNA-HPV detectada foi menor que 7%. Corpo peniano, sulco coronal, glândula, prepúcio e escroto são sítios que contribuem com mais de 95% do HPV genital detectável (GIULIANO et al., 2007).

Existe também variação na prevalência da infecção persistente por HPV e seu clearance, entre os sexos. Estima-se que 20% das mulheres e 6% dos homens desenvolvem infecção persistente (GIULIANO et al., 2008). A chance de clearance é mais alta para os homens (49% vs 31%), ocorrendo num prazo de 7,5 meses. Em infecções por HPV-16, este prazo se estende para 12,2 meses (GIULIANO et al., 2011). Nas mulheres, o curso da infecção dura em média de 8 meses, sendo que 70% das pacientes DNA-HPV positivas tornam-se negativas com o passar de 1 ano e, após 2 anos, apenas 9% permanecem infectadas (FERENCZY, 1995; HO et al., 1998).

Os trabalhos de prevalência da infecção por HPV em homens consultados neste trabalho encontram-se descritos no Quadro 1.

**Quadro 1 - Características da infecção genital por HPV em homens.**

| Autor(es)                                    | Ano  | População estudada (n)                  |      |                     |                   | Prevalência do HPV (%)                             |                                          |                                            |                                                       | Múltiplas infecções (%)                  |
|----------------------------------------------|------|-----------------------------------------|------|---------------------|-------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------|
|                                              |      | Com lesão                               |      |                     | Sem lesão         | Total                                              | Alto risco                               | Baixo risco                                | HPV-16                                                |                                          |
|                                              |      | Câncer                                  | NIP  | Condiloma acuminado |                   |                                                    |                                          |                                            |                                                       |                                          |
| Akogbe et al.                                | 2012 |                                         |      |                     | HIM* (3.909)      | 66,8                                               | 29,7                                     | 22,7                                       | 7,6                                                   |                                          |
| Anic & Giuliano                              | 2011 | Revisão                                 |      |                     |                   | 1,3 a 72,9                                         | 12                                       | 20,7                                       | NIP: 40,7<br>Câncer: 60,2                             | 17,8 a 25,7                              |
| Anic et al.                                  | 2012 |                                         |      |                     | HIM* (2.487)      | Com condiloma 83<br>Sem condiloma 63,9             | Com condiloma 21,4<br>Sem condiloma 11,8 | Com condiloma 18,8<br>Sem condiloma 20,7   |                                                       | Com condiloma 37,5<br>Sem condiloma 16,3 |
| Baldwin et al.                               | 2003 | atendidos em clínica de DSTs (436)      |      |                     |                   | 28,2                                               | 12                                       | 14,8                                       | 2,3                                                   | 6,1                                      |
| Bleeker et al.                               | 2005 |                                         |      |                     | parceiros (238)   | 72,9                                               | 80,3                                     | 37,1                                       | 34,8                                                  | 47,7                                     |
| de Lima Rocha et al.                         | 2008 |                                         |      |                     | parceiros (43)    | 86                                                 | 33                                       | 18,6                                       | 60                                                    | 39,5                                     |
| Dunne et al.                                 | 2006 | Revisão                                 |      |                     |                   | 1,3 a 72,9                                         | 1,3 a 58,6                               | 0 a 43                                     |                                                       | 51,1                                     |
| Franceschi et al.                            | 2002 |                                         |      |                     | parceiros (1.143) | Controle 13<br>Câncer: 18<br>Carcinoma in situ: 21 |                                          |                                            | Controle 2,8<br>Câncer: 5,2<br>Carcinoma in situ: 4,2 |                                          |
| Giuliano et al.                              | 2011 |                                         |      |                     | HIM* (1.159)      | 50                                                 | 30                                       | 38                                         | 6                                                     |                                          |
| Grupo de estudos em homens Brasil-EUA-México | 2008 |                                         |      |                     | HIM* (1.160)      | 65,2<br>Brasil: 72,3                               | 12                                       | 20,7                                       | 6,5                                                   | 25,7                                     |
| Nicolau et al.                               | 2005 |                                         |      |                     | parceiros (50)    | 70                                                 | 32                                       | 14                                         |                                                       | 24                                       |
| Potocnik et al.                              | 2007 |                                         |      | (55)                |                   | 100                                                | 15                                       | 100                                        | 4                                                     | 22                                       |
| Rombaldi et al.                              | 2006 |                                         |      |                     | parceiros (99)    | 54,5                                               | 3,5                                      | 95                                         | 3,5                                                   | 1                                        |
| Rubin et al.                                 | 2001 | (142)                                   | (30) | (12)                |                   | Câncer: 42,2<br>Condiloma: 100<br>NIP 90           | Câncer: 70<br>Condiloma: 8,3<br>NIP 59,3 | Câncer: 1,6<br>Condiloma: 91,7<br>NIP 18,5 | Câncer: 60                                            | Câncer:13,3<br>Condiloma: 0<br>NIP 22,2  |
| Smith et al.                                 | 2011 | Revisão                                 |      |                     |                   | 1,3 a 84                                           | 1,3 a 42,4                               | 0 a 43,2                                   | 0,5 a 45                                              |                                          |
| Vaccarella et al.                            | 2011 |                                         |      |                     | HIM* (3.899)      | 51,3<br>Brasil: 59,7                               |                                          |                                            | 7,5<br>Brasil: 9,2                                    | 27,4                                     |
| Videla et al.                                | 2013 | homo (457) e heterossexuais (191) HIV + |      |                     |                   | Homo: 25<br>Hetero: 27                             | Homo: 19<br>Hetero: 19,9                 | Homo: 10,3<br>Hetero: 10,5                 | Homo: 5<br>Hetero: 7                                  | Homo: 8,6<br>Hetero: 7,8                 |

\* HIM study: homens entre 18-70 anos, assintomáticos, sem relato de diagnóstico prévio de câncer peniano ou anal, sem relato de diagnóstico prévio de verrugas genitais ou anais e sem participação em estudo com vacina para HPV, moradores do sul da Flórida, EUA, São Paulo, Brasil, ou em Cuernavaca, no México.

## 2.4 Fatores de risco da infecção por HPV

*Os fatores de risco associados à infecção por HPV no homem relacionam-se com o comportamento sexual, incluindo o início precoce da atividade sexual, o grande número de parceiros sexuais ao longo da vida, o aumento da frequência do intercursos sexual e a prática de intercursos anal (ANIC & GIULIANO, 2011; CHELIMO et al., 2013; DUNNE et al., 2006; GIULIANO et al., 2008; PARTRIDGE & KOUTSKY, 2006).*

*Trabalhos mostram que a circuncisão reduz o risco de infecção por HPV e o desenvolvimento de câncer peniano (ALBERO et al., 2012; DUNNE et al., 2006; DALING et al., 2005; GIULIANO et al., 2008), além de ser capaz de reduzir a carga viral desta infecção (WILSON et al., 2012). Em trabalho de revisão, Albero et al. (2012) relatam risco de infecção por HPV para homens circuncidados de 0,57 (OR, odds ratio, IC 95%: 0,42-0,77).*

*Em trabalho realizado com 1000 homens que eram parceiros de mulheres portadoras de condiloma acuminado ou neoplasia intraepitelial cervical, 92 (9%) apresentaram lesões sugestivas de infecção por HPV, utilizando-se a biópsia como método de diagnóstico. Destes, 93% apresentaram neoplasia intraepitelial peniana (NIP). Em 75% dos pacientes com NIP I, 93% dos pacientes com NIP II e em todos com NIP III foram encontrados DNA-HPV de alto risco, detectados por hibridização através do método de Southern blot. Homens circuncidados e não circuncidados mostraram taxas semelhantes de infecção por HPV associado a lesões (52% vs 45%). Entretanto, os índices de NIP foram significativamente maiores nos homens não circundados (10% vs 6%) (AYNAUD et al., 1994).*

*O uso regular de preservativo é considerado um fator que reduz o risco de infecção por HPV (DUNNE et al., 2006; WINER et al., 2006). Entretanto, segundo alguns autores, o preservativo pode não ser completamente eficaz contra a infecção, pois o vírus pode ser encontrado em outras regiões anatômicas não protegidas por ele (ANIC & GIULIANO, 2011; DUNNE et al., 2006). Reep et al. (2012) relatam não haver encontrado diferença quanto a prevalência de infecção por HPV em homens que usam regularmente o preservativo para os que não usam. De acordo com Bleeker et al. (2005a), o uso de preservativo auxiliou na regressão de lesões penianas planas somente quando o casal estava infectado pelo mesmo tipo de vírus. Casais que não*

*usaram preservativos e que possuíam o mesmo tipo viral tiveram falha da cura da lesão, o que se deve, provavelmente, à reinfecção (BLEEKER et al., 2005a).*

*A idade e o número de parceiros sexuais durante a vida influenciam na duração da infecção por HPV, sendo esta de menor duração em homens mais velhos e com menor número de parceiras (GIULIANO et al., 2011).*

*As infecções e múltiplas infecções pelo vírus HPV são mais frequentes em homens HIV positivos e a presença desse vírus concomitantemente com o HPV está fortemente associada ao aumento da persistência e recidivas de lesões (PARTRIDGE & KOUTSKY, 2006, VIDELA et al., 2013). Pacientes HIV positivos possuem maior susceptibilidade em desenvolver lesões de alto grau penianas e anais (ALVAREZ et al., 2010; PARTRIDGE & KOUTSKY, 2006). Pacientes HIV positivos apresentam risco 77% maior de evolução para câncer anal do que a população geral (GIMENEZ et al., 2008).*

*Com relação ao desenvolvimento de verrugas genitais, o risco decresce com a idade e aumenta diante de elevado número de parceiros sexuais, assim como em quem pratica sexo anal com homens (HR=4,53), com a frequência de intercursos vaginais (HR=4,14), com o uso infrequente de preservativo (HR=2,44) ou quando o parceiro tem condiloma (HR=2,38) ou outra doença sexualmente transmissível (DST)(HR=1,99) (ANIC et al., 2012).*

## **2.5 Lesões associadas à infecção por HPV**

*A infecção genital pelo HPV pode levar ao desenvolvimento de diferentes lesões, variando desde lesões benignas até o desenvolvimento do câncer. Além das verrugas comuns e genitais, este vírus está associado ao carcinoma cervical, vulvar, peniano, anal, esofagiano, oral, de laringe, dentre outros (LETO et al., 2011).*

### **2.5.1 Condiloma acuminado**

*O condiloma acuminado (verruga genital) consiste em manifestação clínica da infecção por HPV, com ocorrência anual de cerca de 1% da população sexualmente ativa com idade entre 15-49 anos (PARTRIDGE & KOUTSKY, 2006). O período de incubação estimado para o aparecimento desta lesão é de 2 semanas a 8 meses, a maioria aparecendo de 2-3 meses após a infecção (ORIEL, 2000). Cerca de 20-30% regride espontaneamente*

(WILEY et al., 2002). Apesar da infecção por HPV não estar associada à idade (SMITH et al., 2011; SYRJÄNEN, 2011), a incidência de verrugas é maior nos homens mais jovens (< 30 anos) e decresce significativamente com a idade (ANIC et al., 2011; ANDERSON et al., 2009). Condilomas acuminados são altamente infectantes. Em seu trabalho de revisão Bleeker et al. (2006) relatam que 65-76% dos indivíduos que se relacionavam sexualmente com pessoas que apresentavam essa lesão desenvolveram verrugas.

Embora a presença desta lesão não esteja associada com mortalidade, pode desencadear problemas psicossociais (ANIC et al., 2011). Woodhall et al. (2009) consideram as verrugas genitais um problema público de saúde, causando grande custo ao estado e ao próprio indivíduo, com redução em sua qualidade de vida. Nos EUA, o custo anual para o tratamento de verrugas genitais no ano de 2005 foi estimado em US\$ 200 milhões (GIULIANO et al., 2008). Outro estudo, desenvolvido na Dinamarca, mostra um custo anual para o tratamento de câncer cervical de 10,2 milhões por ano e de 8 milhões para o tratamento de condiloma acuminado (OLSEN & JEPSEN, 2010).

Mais de 90% das verrugas genitais em indivíduos imunocompetentes contêm HPV dos tipos 6 e 11, sendo o tipo 6 o mais freqüente (55-90%). Entre indivíduos imunossuprimidos, a detecção de HPV oncogênico é mais frequente, assim como o diagnóstico de verruga genital sem a presença de HPV-6 e HPV-11 (ANIC et al., 2011; GIULIANO et al., 2008).

Infecções causadas por mais de um tipo de HPV são achados frequentes em populações de risco, existindo vários relatos de infecções múltiplas com a presença de HPV de alto risco em lesões condilomatosas (ANIC et al., 2011; BALDWIN et al., 2003; BALL et al., 2011). Em lesões anais de pacientes masculinos imunocomprometidos, a prevalência de múltiplas infecções apresenta-se em torno de 60% e encontra-se associada à persistência de infecção e à progressão de lesão (POIZOT-MARTIN et al., 2009; SALIT et al., 2009). Trabalhos recentes, tanto em homens (VACCARELLA et al., 2011) como em mulheres (CHATUVERDI et al., 2011), demonstram que co-infecções ocorrem ao acaso e que há pouca evidência de aumento de susceptibilidade ou exclusão competitiva/proteção cruzada com qualquer HPV tipo específico. Outros trabalhos relatam a existência de proteção cruzada entre HPVs filogeneticamente próximos (DURHAM et al., 2012; WHEELER et al., 2009; XI

et al., 2009). Por outro lado, aspectos como comportamento sexual e a resposta imunológica podem influenciar na prevalência de múltiplas infecções (CHATUVERDI et al., 2011). Segundo Anic et al. (2011), o tempo necessário para o aparecimento de verrugas quando existe múltiplas infecções é maior do que quando existe infecção somente pelos vírus de baixo risco 6 e 11.

Quanto ao tratamento de verrugas genitais, Lacey et al. (2013) relatam que recidivas são algo comum e ocorrem depois de todos os tratamentos existentes, com taxas de cerca de 20-30% ou mais. Todos os tratamentos estão associadas com reações locais na pele, incluindo prurido, queimação e, algumas vezes, erosões e dor. Os autores reforçam que a escolha do tipo de tratamento fica a critério médico, sendo recomendado acompanhamento do paciente, pelo menos, a cada 4 semanas, com mudança de tratamento se uma resposta inadequada for observada.

### **2.5.2 Neoplasias intraepiteliais penianas (NIP)**

A NIP é uma condição heterogênea, constituída por lesões que, atualmente, não possuem protocolos padronizados para o diagnóstico clínico (ANIC & GIULIANO, 2011).

Devido às semelhanças histológicas com as lesões cervicais, as NIP também são classificadas em graus I, II e III de acordo com o grau de comprometimento da espessura epitelial pelas células alteradas. Também podem ser classificadas como lesões intraepiteliais de baixo e alto grau (CUBILLA et al., 2004). Condilomas planos ou papilomatosos podem ser classificados como lesões de baixo grau. As lesões de alto grau apresentam atipias mais frequentes e acentuadas. O desenvolvimento de NIP de alto grau é raro e fatores de risco para esta condição não são conhecidos assim como a probabilidade destas lesões progredirem para câncer invasivo (ANIC & GIULIANO, 2011; BRADY et al., 2012). Estudos estimam que cerca de 60-100% das NIP são positivas para DNA-HPV (AYNAUD et al., 1994; KRUSTRUP et al., 2009; RUBIN et al., 2001; WIELAND et al., 2000).

Embutido no conceito de lesão de alto grau encontram-se três entidades clínicas distintas: a doença de Bowen, a eritroplasia de Queyrat e a papilomatose bowenóide. Todas estas três lesões possuem características semelhantes ao carcinoma peniano “in situ” mas diferem quanto a

epidemiologia, apresentação clínica e o potencial maligno (BRADY et al., 2012).

*Doença de Bowen é vista geralmente em homens idosos. Consiste em uma placa única avermelhada, bem definida, que pode ter áreas de exsudação ou crostas. Desenvolvimento de ulceração ou crescimento nodular pode sugerir progressão para carcinoma invasor, o que ocorre em cerca de 5% dos casos (BRADY et al., 2012).*

*A eritroplasia de Queyrat também é mais comum em homens mais velhos não circuncidados. As lesões são solitárias e bem definidas, de aspecto aveludado, formando placas brilhantes vermelhas geralmente localizadas na glândula, prepúcio e sulco coronal. Transformação desta lesão para carcinoma invasor ocorre em cerca de 10 a 33% dos casos (BRADY et al., 2012).*

*Papilomatose bowenoide é mais comumente vista em homens jovens, com cerca de 30 anos, ocorrendo principalmente no corpo peniano, na glândula e no prepúcio. Macroscopicamente essas lesões são constituídas por múltiplas pápulas, pequenas, 2 a 10 mm, bem demarcadas, ligeiramente elevadas, vermelhas ou violáceas, podendo ser verrucosas ou papilomatosas. Esta lesão é predominantemente transitória e tende a ter curso benigno. Raramente evolui para carcinoma escamoso, podendo ocorrer regressão espontânea (BRADY et al., 2012).*

*Um novo sistema de classificação tem sido proposto, denominando as NIP em dois tipos: diferenciadas e indiferenciadas/bowenóides (CHAUX et al., 2012; RENAUD-VILMER et al., 2010). Estas lesões apresentam dois mecanismos de formação, respectivamente, um não associado ao HPV e outro HPV dependente. As NIP diferenciadas são caracterizadas pela presença de acantose, maturação epitelial anormal com atipia celular nas regiões basais/parabais ou acima, queratinócitos amplos com abundante eosinofilia citoplasmática, pontes intercelulares proeminentes, núcleos vesiculares e ocasionais nucléolos proeminentes, hiperqueratose e formação de pérolas córneas. Por outro lado, as NIP indiferenciadas/bowenóides podem apresentar três variantes: 1) NIP basalóide, onde o epitélio é substituído por uma população de células de tamanho pequeno a médio, redondas a ovais, imaturas, com alta relação núcleo/citoplasmática. A superfície epitelial é plana ou ligeiramente irregular, com parakeratose e coilocitose focal; 2) NIP condilomatosa,*

caracterizada por epitélio espessado, com paraceratose, pleomorfismo celular, coilocitose e disqueratose; e 3) NIP condilomatosa-basalóide caracterizada por sobreposição de ambos os tipos, basalóide nos 2/3 basais do epitélio e aspecto condilomatoso na superfície. A NIP diferenciada está mais associada ao carcinoma de células escamosas ceratinizante enquanto que as NIPs condilomatosa e basalóide são encontradas mais frequentemente acompanhando os carcinomas condilomatosos e/ou basalóides (BRADY et al., 2012; RENAUD-VILMER et al., 2010).

Segundo alguns autores, o uso da terminologia desta classificação, em NIP diferenciada e indiferenciada seria mais apropriada, uma vez que ela reflete melhor a patogênese e a história natural destas lesões (BRADY et al., 2012; RENAUD-VILMER et al., 2010).

### **2.5.3 Câncer peniano**

O câncer peniano representa 0,5% dos cânceres em homens, sendo que, no Brasil, a prevalência é de 2,9 a 6,8 por 100.000 homens (FAVORITO et al., 2008), uma das mais altas do mundo (PARKIN et al., 2008). Sua associação com o HPV ocorre em cerca de 30-80% (AYALA et al., 2005; GIULIANO et al., 2008; PARTRIDGE & KOUTSKY, 2006).

Existem evidências associadas a uma relativa resistência da mucosa peniana à ação oncogênica do HPV (AYALA et al., 2005; GIULIANO et al., 2011; MARKS et al., 2011). O mecanismo de proteção ainda não está completamente claro. Uma das hipóteses mais aceitas é a ausência nessa região anatômica da junção escamo-colunar. Nesta região, o HPV pode infectar as células metaplásicas que possuem alto potencial de multiplicação e um microambiente próprio (HERFS et al., 2012; HWANG et al., 2012; McNAIRN & GUASCH, 2011; PARTRIDGE & KOUTSKY, 2006). Células existentes na junção escamo-colunar expressam uma série de marcadores, como o Krt7, AGR2, CD63, MMP7 e GDA, que não são expressos nas células escamosas da ectocérvice, mas são abundantes nas lesões de alto grau e no câncer cervical (HERFS et al., 2012). Dados de prevalência de associação da infecção por HPV e câncer anal podem reforçar essa hipótese, uma vez que essa região também possui a junção escamo-colunar (KALANTARI et al., 2008; POW-SANG et al., 2010).

Outra hipótese seria a influência hormonal (CHUNG et al., 2013). Mulheres que usam estradiol têm um risco 4 vezes maior de desenvolver lesões de alto grau (MOSCICKI et al., 2012). Este hormônio afeta o bom funcionamento da resposta imune local, predispondo ao surgimento de lesões (de VILLIERS, 2003; FREGA et al., 2007; HUGHES & CLARK, 2007). Matsumoto et al. (2006) relatam que o uso de contraceptivos orais aumenta a transcrição das oncoproteínas E6 e E7, resultando em perda da proteção antitumoral. Chung et al. (2012) argumentam que receptores para estrógeno (ER $\alpha$ ) fornecem um grande sinal mitogênico para as células basais do epitélio cervical, que por sua vez suporta a proliferação celular pelo HPV. Apesar das diferenças anatômicas e hormonais, parece existir semelhanças na patogênese do câncer cervical e peniano (KALANTARI et al., 2008) embora observa-se maior similaridade entre carcinoma peniano e vulvar (RENAUD-VILMER et al., 2010).

O carcinoma de células escamosas invasor é o tipo de tumor mais freqüente do pênis e acomete principalmente o epitélio escamoso da glândula, sulco coronal e prepúcio. Enquanto os carcinomas afetam preferencialmente a parte distal do pênis, os sarcomas têm preferência pelo corpo peniano.

Constituem variantes histológicas do carcinoma de células escamosas os carcinomas basalóide, condilomatoso, verrucoso, papilífero, sarcomatóide, misto e adenoescamoso.

Tumores penianos basalóides e condilomatosos estão fortemente associados ao HPV (80-100%), sendo a presença do HPV-16 detectada em 60-88% dos casos (DALING et al., 2005; DO et al., 2013; GIULIANO et al., 2008). A prevalência do HPV em carcinomas penianos verrucosos é de 31-35%, sendo 60-70% deles causados pelo HPV-16 (GIULIANO et al., 2008).

Scheiner et al. (2008) estudaram 80 casos de câncer peniano em homens atendidos em três diferentes hospitais do Rio de Janeiro. Destes, 72 mostraram características de carcinoma escamoso invasor e 8 de carcinoma verrucoso. No total, 72,5% dos casos mostraram positividade para DNA-HPV pela técnica de PCR. Dentre os casos de carcinoma escamoso invasor, 75% estavam associados à infecção por HPV, enquanto que dentre os pacientes com carcinoma verrucoso, 50% dos casos eram DNA-HPV positivos. Vírus de alto risco foram encontrados em 27,8% e 25% dos casos de carcinoma escamoso

*invasor e verrucoso, respectivamente. Nesse trabalho, os autores consideram que a infecção por HPV possa ter contribuído para a transformação maligna na maioria dos casos estudados. Metástase em linfonodos, após a cirurgia, foi detectada em 34,7% dos casos de carcinoma escamoso invasor. Nenhuma metástase foi detectada nos pacientes que apresentavam carcinoma verrucoso.*

*Segundo a revisão de Pow-Sang et al. (2010), os fatores de riscos associados ao câncer peniano são: fimose, responsável por 25-60% dos casos; circuncisão como fator protetor, uma vez que homens não circuncidados possuem risco para o câncer aumentado de 3 vezes; fumo (>10 cigarros por dia) que aumenta o risco em 2,14 vezes e presença de condiloma acuminado (3,7 vezes), sendo a infecção por HPV associada a 1-73% dos casos de câncer. Segundo esta mesma revisão, o câncer peniano é 10 vezes menos comum que o câncer cervical. Além disso, tem sido também relatado que o hábito de fumar associa-se a um aumento de 4 a 5 vezes no risco de desenvolver carcinoma peniano (DALING et al., 2005).*

## **2.6 Carga viral e estado físico do DNA-HPV**

*São poucos os trabalhos que avaliam a carga viral e o estado físico do DNA-HPV em homens e existem muitas variações quanto aos métodos utilizados para determiná-los. Alguns trabalhos utilizam amostras penianas, outros anais, alguns são realizados em homens imunocompetentes, outros em imunodeficientes. Os métodos utilizados para determinação de carga viral e do estado físico também diferem, existindo grande variabilidade no modo de calculá-los e expressá-los. Um fator que pode ser constatado frequentemente nos trabalhos onde a determinação da carga viral é o foco de estudo refere-se à sua grande variabilidade.*

### **2.6.1 Carga viral**

*Existem evidências de associação entre o tipo de HPV detectado e a presença de lesões cervicais, além da associação entre altas cargas virais e a progressão destas lesões. Van Duin et al. (2002) mostraram que mulheres com citologia normal e carga viral maior que  $2,4 \times 10^4$  cópias por raspado, apresentavam aumento no risco de desenvolver neoplasia intraepitelial cervical*

(NIC) II e III, enquanto que as mulheres com citologia anormal apresentavam carga viral maior que  $4,3 \times 10^6$  cópias por raspado. Monnier-Benoit et al. (2006) mostraram que 14% das mulheres com carga viral menor ou igual a 200 cópias por  $10^3$  células apresentaram progressão para NIC II/III em 18 meses e esta mesma evolução foi observada em 48% das mulheres com carga viral maior que 200 cópias por  $10^3$  células, no mesmo espaço de tempo. Em trabalho realizado por Lörincz et al. (2002), o risco relativo para evolução para NIC II foi maior com o aumento da carga viral, durante os 9 primeiros meses; após esse período (mulheres foram acompanhadas até o 122º mês) essa relação não foi mais verificada.

Alguns autores consideram a carga viral um fator preditivo para persistência e gravidade de lesão.

Ramanakumar et al. (2010) demonstraram associação entre carga viral e persistência do HPV-16 e 18 em mulheres jovens no início da vida sexual e que o fenômeno da integração é um evento comum que ocorre precocemente durante a infecção. A velocidade de clearance da infecção causada pelo HPV, além de estar relacionada à carga viral parece ser tipo-específica, onde os HPV-16 e 18 são os mais persistentes.

Marks et al. (2011) encontraram uma carga viral média em lesões de alto grau de 3.250,8 cópias/ $10^4$  células e em amostras normais 87,5 cópias/ $10^4$  células e associaram um declínio maior que 2 vezes no logaritmo da carga viral à predição de clearance da infecção.

Kim et al. (2012) acompanharam a evolução clínica de 817 mulheres, infectadas pelo HPV e que possuíam diagnósticos histológicos de normalidade ou NIC I. Estas pacientes retornavam a cada 4 ou 6 meses para nova consulta. O diagnóstico clínico foi associado ao tipo viral, se oncogênico ou não, e com a carga viral por meio da técnica de captura híbrida (HC-2). O tempo de seguimento total foi de até 2 anos ou até se observar o clearance ou progressão da lesão. Do total de pacientes acompanhadas, 79% tiveram em até 2 anos, 8% progrediram para NIC II ou maior e 13% continuaram com a lesão em grau I. Neste trabalho a evolução clínica foi significativamente associada à carga viral. Cargas virais mais altas foram associadas à persistência de infecção e progressão de lesão, assim como cargas mais baixas associadas ao clearance.

Ao contrário do exposto acima, Cheung et al. (2006) trabalhando com mulheres com lesões escamosas em diferentes graus induzidas por HPV não encontraram diferença significativa entre as cargas virais de diferentes lesões. Argumentam que a replicação viral não é necessária para a manutenção do fenótipo canceroso. De forma semelhante, Carcopino et al. (2011) também verificaram que a carga viral não foi preditiva para persistência ou para o desenvolvimento de lesões neoplásicas.

Uma menor carga viral tem sido relatada nas infecções por HPV em homens, quando comparada às mulheres (BLEEKER et al., 2005b; FRANCESCHI et al., 2002; PARTRIDGE & KOUTSKY, 2006).

Heideman et al. (2007) pesquisaram a carga viral do HPV-16 em 83 amostras de bloco de parafina de carcinoma peniano primário de células escamosas, utilizando a técnica de PCR em tempo real (Roche). Destas amostras, 55% foram positivas para a infecção por HPV, sendo 52% destas infectadas pelo HPV-16 (n=24). Múltiplas infecções foram encontradas em 18% dos pacientes infectados. As amostras positivas para o DNA-HPV-16 foram avaliadas quanto à expressão do gene E6 e subdivididas em amostras positivas e negativas para este RNA mensageiro (mRNA). A mediana da carga viral das amostras onde E6 era expresso foi de 72 cópias virais/célula com variações de 8,5 a 2.667. As amostras negativas para mRNA apresentaram mediana de carga viral de 0,5 cópias/célula e variações de 0,04 a 2. Neste trabalho, os níveis de expressão do gene E6 acompanharam os níveis de carga viral.

Ball et al. (2011) estudaram a carga viral do HPV em pacientes com condiloma acuminado (31 homens e mulheres) utilizando o método de PCR em tempo real (TaqMan). Todas as amostras foram positivas para DNA-HPV, sendo 35% infectadas pelos HPV-16 ou 18, ou por ambos. A prevalência dos HPVs-6/11 foi de 97%. Múltiplas infecções foram determinadas em 71% das amostras, sendo 48% dos condilomas infectados por vírus de alto e baixo risco, concomitantemente. Foram encontradas cargas virais para os HPV-6, 11 e 16 entre os valores de 2 a 870 cópias/célula. Apenas três amostras foram positivas para HPV-16, sendo as cargas virais encontradas de 11, 16 e 177 cópias/célula. A expressão do gene E6 também foi avaliada e não foi

encontrada associação entre carga viral e expressão, questionando-se assim a importância da carga viral no surgimento da lesão.

Em outro trabalho, Bleeker et al. (2005b) estudaram 238 casais heterossexuais, com tempo de relacionamento oscilando entre 0,6 a 35 anos. Foram utilizadas amostras de células penianas e cervicais e a carga viral do HPV-16 avaliada pelo método de PCR em tempo real (Roche). A infecção por HPV foi identificada em 89,9% das mulheres e em 72,9% dos homens. A prevalência do HPV-16 foi de 52,9% nas mulheres e 59,4% nos homens. Múltiplas infecções foram mais prevalentes nos homens (47,7%) que em mulheres (28,2%), havendo concordância no tipo viral em 37% dos casais. Das amostras penianas encaminhadas para o teste de carga viral, apenas 22 foram satisfatórias. A mediana de carga viral encontrada nos homens foi de 5 cópias virais/célula com variações de 0 a 210. As maiores cargas virais foram encontradas nos casais concordantes.

Grande parte dos trabalhos de carga viral em homens foi realizada em pacientes HIV positivos, utilizando-se amostras anais com ou sem a presença de lesões. Cargas virais mais altas foram encontradas nestes pacientes. Pierangeli et al. (2008), ao comparar a carga viral de pacientes HIV positivos e negativos pelo método de PCR em tempo real (TaqMan) em amostras anais, encontraram maior prevalência de HPV nos pacientes positivos (81% vs 68%) inclusive dos tipos virais de alto risco (46% vs 36%). A média de carga viral total encontrada nos pacientes HIV positivos foi de 178.473,28 cópias virais/ ng de DNA, considerando os vírus de alto risco, 22.040,80 cópias virais/ ng de DNA, para os vírus de baixo risco e 31.440,75 e 3.090,52, para os vírus de alto e baixo risco, respectivamente, em pacientes negativos para o HIV. Grandes variações de carga viral também foram determinadas, sendo estas para os vírus de alto risco, de 10 a  $2 \times 10^5$  cópias/ng de DNA e, para os vírus de baixo risco, de  $42-1,2 \times 10^6$  cópias virais/ng de DNA. Neste trabalho amostras com alterações citológicas possuíam maior carga viral, sendo esta considerada como marcador de persistência e progressão para neoplasia intraepitelial anal (NIA).

Outros trabalhos relatam a correlação de carga viral com a presença de lesões anais. Salit et al. (2009), em trabalho com 224 pacientes HIV positivos, utilizando o método de PCR em tempo real (SYBR Green) e amostras

coletadas com swab anal compararam a presença e o grau de lesões com a carga viral. Entre os pacientes, 75% apresentaram condilomas acuminados, 28% mostraram biópsia normal, 39% NIA I e 33% NIA II. Do total, 93% estavam infectados pelo HPV, sendo 79% por HPVs de alto risco. Múltiplas infecções foram encontradas em 58% dos casos. A presença de HPV-16 foi associada a um aumento de 2,58 vezes no risco de desenvolver lesões anais. Houve diferenças significativas quanto à carga viral nas diferentes lesões, sendo a carga viral do HPV-16 associada à presença de lesão de alto grau em células anais de pacientes HIV positivos, assim como múltiplas infecções. A expressão de E6 também foi avaliada e não foram encontradas diferenças significativas da quantidade desses transcritos entre as diferentes lesões. Pontos de corte entre 100 e 10.000 cópias virais foram testados quanto a sua associação com lesões anais com o objetivo de se determinar uma carga viral de risco para o desenvolvimento destas lesões, mas nenhum valor foi estatisticamente significativo.

Poizot-Martin et al. (2009) também encontraram associação entre carga viral de HPVs de alto risco e o desenvolvimento de lesões intraepiteliais anais estudando 52 pacientes HIV positivos, 33 homens e 19 mulheres, pelo método de PCR em tempo real e amostras de swabs anais. Dos pacientes analisados, 79% estavam infectados pelo HPV. Nos pacientes masculinos, a presença de HPV foi determinada em 85%, sendo 82% HPVs de alto risco, 64% HPV-16, 25% HPV-18, 39% HPV-6 e 14% HPV-11. Múltiplas infecções foram determinadas em 61% das amostras testadas. Foi encontrada uma prevalência de 36% para lesões anais. A mediana de carga viral encontrada para o HPV-16 foi menor em homens (3.110.000 cópias virais/  $10^6$  células) que nas mulheres (44.500.000 cópias virais/  $10^6$  células).

Sanclemente et al. (2007) detectaram carga viral em 37 homens HIV positivos portadores de lesão anal; 19 possuíam verrugas e 18 NIA I. Foram utilizadas amostras de biópsia e as amostras quantificadas por densitometria dos produtos de PCR detectados nos géis. HPVs de alto risco foram encontrados em 20% destas lesões e múltiplas infecções em 28% dos casos. Neste trabalho não foi encontrada relação entre carga viral e recidivas de verrugas, diferentemente do que foi relatado por outros autores como De Marco et al. (2001) e Che et al. (2005).

*Homens que se relacionam sexualmente com outros homens são mais susceptíveis a lesões anais, sendo que em indivíduos HIV positivos essas chances aumentam. Kreuter et al. (2007) encontraram uma prevalência de infecção por HPV em neoplasias intraepiteliais anais de 81% nesta população. A carga viral média foi de 92 cópias de DNA/cópias de  $\beta$ -globina. Variações entre 0,03 e 17.634 cópias de DNA/cópias de  $\beta$ -globina foram encontradas.*

*Diversos trabalhos em homens mostram associação de alta carga viral com persistência e progressão de lesões (ALVAREZ et al., 2010; BLEEKER et al., 2005b; BLEEKER et al., 2006; de MARCO et al., 2001; PIERANGELI et al., 2008; SALIT et al., 2009). Entretanto, Ball et al. (2011) trabalhando com amostras de verrugas genitais relatam que pequenas cargas virais são capazes de produzir níveis tão altos de mRNA das proteínas oncogênicas, como infecções com altas cargas virais. Trabalhos realizados com amostras femininas reforçam esta afirmação onde baixa carga viral não exclui progressão, podendo ser considerada como um possível preditor de clearance de infecção (FU XI et al., 2011; LO et al., 2005; LOWE et al., 2011; MONNIER-BENOIT et al., 2006).*

*Atualmente, os estudos são controversos quanto ao significado da carga viral para o risco de desenvolvimento e progressão de lesão. Assim, tem sido questionado o uso de carga viral como biomarcador de lesões, sugerindo a utilização da quantificação da expressão das proteínas oncogênicas como um melhor marcador (ALVAREZ et al., 2010; BALL et al., 2011; BROCCOLO et al., 2012). Os trabalhos consultados sobre carga viral do HPV em homens encontram-se descritos no Quadro 2.*

**Quadro 2 - Carga viral do HPV em lesões do trato genital masculino**

| Autores<br>(Ano)            | Metodologia                                           | População (n)                                                              | HPV+<br>(%)                                                             | Carga viral em<br>lesões anogenitais<br>(Unidade)                                                                                                                                                                                                            | Carga viral em lesões penianas<br>(Unidade)                                                                                                                                                                               |     |        | Carga viral em lesões anais<br>(Unidade) |                                                                                                    |        |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|                             |                                                       |                                                                            |                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                              | Condiloma                                                                                                                                                                                                                 | NIP | Câncer | Condiloma                                | NIA                                                                                                | Câncer |
| Alvarez<br>et al.<br>(2010) | PCR em<br>tempo real<br>TaqMan                        | HIV +<br>Homos-sexuais<br>(247)                                            | HPV-16<br>(54,7)                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                           |     |        |                                          | Epissomal<br>0,1 a 31.289<br>Mediana 22,3<br>Integrado<br>0 a 31.7<br>Mediana 0<br>(cópias/célula) |        |
| Ball et al.<br>(2011)       | PCR em<br>tempo real<br>TaqMan                        | Homens e<br>mulheres<br>(31)<br>Condilomas<br>anogenitais                  | Total (100)<br>HPV-6 (90)<br>HPV-11<br>(32)<br>HPV alto<br>risco (48)   | HPV-6<br>2 a 870<br>HPV-11<br>51 a 558<br>HPV 16<br>11 a 177<br>(cópias/célula)                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                           |     |        |                                          |                                                                                                    |        |
| Bleeker<br>et al.<br>(2005) | Light Cycler<br>Real time                             | Casais<br>heterossexuais<br>Homens<br>(181)                                | HPV-16<br>(34,8)<br>HPV-18<br>(3,9)<br>HPV-31<br>(5)<br>HPV-33<br>(5,5) |                                                                                                                                                                                                                                                              | Não houve descrição de lesão<br>Esfregaço peniano<br>HPV-16: 0 a 210<br>Mediana: 5<br>HPV-18: 1,7 a 209,3<br>Mediana: 105,5<br>HPV-31: 1,7 a 6,3<br>Mediana: 4<br>HPV-33: 0,7 a 406,6<br>Mediana: 22,5<br>(cópias/célula) |     |        |                                          |                                                                                                    |        |
| Che et al.<br>(2005)        | Sistema de<br>detecção<br>GeneAmp<br>5700<br>Sequence | Homens (33) e<br>mulheres (30)<br>Condilomas<br>primários e<br>recorrentes | HPV-6/11<br>(98,4)<br>HPV-16/18<br>(11,3)                               | HPV 6/11<br>Primário<br>$1,4 \times 10^3$ a $6,7 \times 10^7$<br>Recorrente<br>$1,2 \times 10^4$ a $3,6 \times 10^8$<br>HPV-16/18<br>Primário<br>$1,9 \times 10^3$ a $1,6 \times 10^4$<br>Recorrente<br>$1,4 \times 10^5$ a $1,7 \times 10^7$<br>(cópias/mL) |                                                                                                                                                                                                                           |     |        |                                          |                                                                                                    |        |

**Quadro 2 - Continuação - Carga viral do HPV em lesões do trato genital masculino**

| Autores<br>(Ano)                      | Metodologia                    | População (n)                                   | HPV+<br>(%)                    | Carga viral em<br>lesões anogenitais<br>(Unidade) | Carga viral em lesões penianas<br>(Unidade)                                                                |     |                                                                                                | Carga viral em lesões anais<br>(Unidade)                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                            |        |
|---------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|                                       |                                |                                                 |                                |                                                   | Condiloma                                                                                                  | NIP | Câncer                                                                                         | Condiloma                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | NIA                                                                                                                                                                                        | Câncer |
| Do et al.<br>(2013)                   | PCR em<br>tempo real<br>SYBR   | Amostras de<br>câncer<br>peniano<br>(120)       | HPV+<br>(23)<br>HPV-16<br>(89) |                                                   |                                                                                                            |     | 0,002 a 1.239<br>Média: 0,4<br>Mediana:<br>(≥ 1): 60,1255<br>(< 1): 0,0355<br>(cópias/ célula) |                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                            |        |
| Pierangeli<br>et al.<br>(2008)        | PCR em<br>tempo real<br>TaqMan | Homens<br>HIV+ (36)<br>HIV- (25)                | HIV+ (81)<br>HIV - (68)        |                                                   |                                                                                                            |     |                                                                                                | Sem descrição de lesão<br>Esfregaço anal<br>HIV+: Sonda HPV alto risco<br>Média 178.473,28<br>Sonda HPV baixo risco<br>Média 22.040,8<br>HIV-: Sonda HPV alto risco<br>Média 31.440,75<br>Sonda HPV baixo risco<br>Média 3.090,52<br>(cópias/ng de DNA)                                                     |                                                                                                                                                                                            |        |
| Poizot-<br>Martin et<br>al.<br>(2009) | PCR em<br>tempo real<br>Duplex | Homens (33) e<br>mulheres (19)<br>HIV +         |                                |                                                   |                                                                                                            |     |                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | HPV-16<br>3,6x10 <sup>3</sup> a 44x10 <sup>9</sup><br>Média: 5x10 <sup>6</sup><br>HPV-18<br>6x10 <sup>2</sup> a 8x10 <sup>7</sup><br>Média: 3,2x10 <sup>5</sup><br>(cópias/milhão células) |        |
| Salit et al.<br>(2009)                | PCR em<br>tempo real<br>SYBR   | Homens HIV+<br>(224)                            | (93)                           |                                                   |                                                                                                            |     |                                                                                                | Normal ou NIA-I<br>HPV-16: 3,8 a 5,32, Média: 4,73<br>HPV-18: 3,91 a 6,47, Média: 5,37<br>HPV-31: 3,86 a 5,07, Média: 4,08<br>NIA-II/ III<br>HPV-16: 4,69 a 6,13, Média: 5,18<br>HPV-18: 5,16 a 7,04, Média: 6,01<br>HPV-31: 4,82 a 5,9, Média: 5,52<br>(log <sub>10</sub> cópias/ 10 <sup>5</sup> células) |                                                                                                                                                                                            |        |
| Wilson et<br>al.<br>(2012)            | PCR em<br>tempo real<br>TaqMan | Homens HIV-<br>Circuncidados<br>ou não<br>(972) | (27,4)                         |                                                   | Não foi avaliado lesão/ Esfregaço<br>Média: Não circuncidado: 130,3<br>Circuncidado: 127<br>(cópias/ 5 µL) |     |                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                            |        |

### 2.6.2 Estado físico do DNA-HPV

*Devido à integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro no processo de carcinogênese cervical e consequente maior expressão do gene E6 e poucas cópias do gene E2, trabalhos recentes têm sugerido que a relação entre o número de cópias do gene E2 e do gene E6 (relação E2/E6) poderia ser usada como possível marcador para a evolução de lesões (CRICCA et al., 2007; YOSHIDA et al., 2008).*

*No trabalho realizado por Cricca et al. (2007) foram estudadas 166 mulheres: 72 apresentavam lesões de baixo grau (NIC I), 83 lesão de alto grau NIC II/III e 11 carcinoma cervical escamoso. Todas tiveram suas lesões associadas ao estado físico do genoma viral. A forma epissomal foi considerada quando a relação E2/E6 apresentou valores variando de 0,93 a 1,08; a forma integrada para valor de  $E2/E6 = 0$  e formas mistas (epissomal e integrada) para os valores entre esses dois extremos. Os resultados mostraram que 72,2% das mulheres com NIC I apresentavam o genoma viral na forma epissomal, 27,8% na forma mista e 0% na forma integrada. A maioria das mulheres com diagnóstico de NIC II/III (73,5%) apresentou forma mista, 20,5% na forma epissomal e 6% na forma integrada. Dentre as mulheres com carcinoma, 81,8% possuíam forma integrada, 18,2% mix e 0% forma epissomal.*

*Arias-Pulido et al. (2006), trabalhando com mulheres portadoras de carcinoma in situ e invasor, encontraram, respectivamente para esses grupos, 61,9% do DNA-HPV-16 na forma epissomal, 29,4% na forma mista e 8,7% integrado e 39,1% epissomal, 45,7% mista e 15,2% integrado. A diferença estatística encontrada entre os dois grupos foi significativa. Esses autores relatam que na forma mista, a expressão de E2 das formas epissomais pode regular os genes E6 e E7 dos vírus integrados e que a capacidade de detecção de baixas frequências de integração do HPV-16 é altamente limitada devido à presença comum e abundante da forma epissomal.*

*Durante a integração, Arias-Pulido et al. (2006) relataram também uma prevalência de quebra no gene E2 de 67,6%, na região codificadora da porção aminoterminal da proteína E2 e 78,4%, na região de dobradiça desse mesmo gene. Pequena é a probabilidade de quebra no gene E1. Cheung et al. (2006) relatam uma probabilidade de quebra na região codificadora da porção*

aminoterminal da proteína E2 de 86,5% dos casos e de 12,2% na região de dobradiça.

Kalantari et al. (2008) estudaram a presença de metilação do DNA viral, a variação genômica do HPV-16 e a frequência de integração viral, utilizando o método de PCR invertido, seguido por ligação reversa em 15 amostras de carcinoma peniano de homens brasileiros. Dentre as amostras estudadas, 11 (73%) apresentaram DNA viral integrado ao DNA celular (6 na forma integrada e 5 na forma mista, apenas 4 episomal). Com base nos dados obtidos, tais como a frequente metilação do DNA viral e a integração genômica, além da alta prevalência de variantes de HPV de alto risco (HPV-16 AA), os autores sugerem que o carcinoma peniano pode apresentar parâmetros etiológicos e epidemiológicos similares ao do colo uterino HPV-dependente. Este estudo demonstra que metilações podem ocorrer: 1) na região LCR viral reprimindo a transcrição do DNA do HPV em células indiferenciadas, sendo esta metilação perdida no processo de diferenciação celular; 2) nas regiões de junção do DNA-HPV e DNA do hospedeiro, acontecimento aparentemente importante na carcinogênese; 3) em sequências promotoras impedindo a ligação de E2 (repressor) e favorecendo a ligação de ativadores (como Sp1).

Tornesello et al. (1997) também encontraram uma maior prevalência do estado físico integrado do HPV-16 (80%) em amostras de câncer peniano. Foram analisadas 13 amostras, sendo 5 infectadas pelo HPV-16.

O estudo de Alvarez et al. (2010) é o único de nosso conhecimento que compila informações de carga viral e estado físico do DNA-HPV-16 em amostras masculinas. Os autores trabalharam com 247 homens HIV positivos. Amostras anais foram coletadas e a infecção pelo HPV-16 foi encontrada em 55% delas. Foi utilizado o método de PCR em tempo real, sendo o estado físico do DNA-HPV determinado pela razão E6/E2 e a carga viral correspondente ao estado pela subtração dos valores encontrados para o gene E2 dos gene E6. Múltiplas infecções foram encontradas em 96,3% destas amostras e foram associadas a lesões intraepiteliais anais de alto grau (OR=1,4, IC 95%: 1.1–1.8). A mediana da carga viral das amostras onde o HPV-16 mostrou-se integrado foi de 0 cópias virais/célula com variações de 0 a 31,7. Para as amostras com estado físico episomal a mediana foi de 22,3 cópias virais/célula com variações de 0,1 a 31.289. Neste trabalho, 94,3% das

amostras anais coletadas estavam na forma epissomal, 3,3% na forma mista e 1,4% integrada. A quantidade de HPV-16 epissomal foi associada com AIN de alto grau (OR=1,5; IC 95%: 1,1-2,1). O fenômeno de integração não foi associado à gravidade de lesão e nem à progressão das mesmas. Foram encontrados 12% de integração em amostras sem AIN, 9,8% nas NIA I e 3,5% nas amostras de NIA II/III, não havendo diferença estatística entre elas. Apenas 16,7% das amostras que evoluíram para NIA II/III estavam integradas. Neste trabalho, o fumo foi associado às lesões de alto grau com OR=4,8 (IC 95%: 1,3-18,6).

Do et al. (2013) trabalharam com 120 amostras de câncer peniano, das quais 27 (22,5%) encontravam-se infectadas pelo HPV. Neste trabalho, 89% das amostras infectadas apresentaram algum grau de integração (39% integradas e 50% forma mista). O HPV-16 foi o mais prevalente sendo identificado em 89% das amostras (24/27). A mediana da carga viral do HPV-16 encontrada, utilizando-se o método de PCR em tempo real (SYBR Green), foi de 60,1255 e 0,0355 cópias/célula, para os grupos de amostras consideradas como de alta e baixa carga viral respectivamente. A variação da carga viral encontrada para os mesmos grupos foi de 10,7-1239 cópias/célula para o grupo com alta carga e 0,002-0,322 cópias/célula para o de baixa.

No Quadro 3 estão apresentados os resultados dos diferentes estudos consultados que investigaram o estado físico do DNA-HPV-16 em lesões do trato genital masculino.

**Quadro 3 - Estado físico do DNA-HPV-16 em lesões do trato genital masculino.**

| Autores<br>(Ano)            | Metodologia                                     | População (n)                             | HPV+ (%)<br>amostras<br>analisadas | Estado físico em lesões penianas<br>(n) % |     |                                                               | Estado físico em lesões anais<br>(n) % |                                                  |        |
|-----------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|--------|
|                             |                                                 |                                           |                                    | Condiloma                                 | NIP | Câncer                                                        | Condiloma                              | NIA                                              | Câncer |
| Alvarez et al.<br>(2010)    | PCR em<br>tempo real<br>TaqMan                  | HIV +<br>Homos-<br>sexuais<br>(247)       | HPV-16<br>(54,7)<br>658            |                                           |     |                                                               |                                        | Epissomal: 94,3<br>Misto : 3,3<br>Integrado: 1,4 |        |
| Do et al.<br>(2013)         | PCR em<br>tempo real<br>SYBR                    | Amostras de<br>câncer<br>peniano<br>(120) | HPV+ (23)<br>HPV-16 (89)<br>18     |                                           |     | Integrado (7)<br>39<br>Misto (9)<br>50<br>Epissomal (2)<br>11 |                                        |                                                  |        |
| Kalantari<br>et al. (2008)  | Reverse<br>ligation<br>inverted PCR<br>(rliPCR) | Amostras de<br>câncer<br>peniano<br>(24)  | HPV-16 (79)<br>15                  |                                           |     | Integrado (11)<br>73<br>Misto ou epissomal (4)<br>27          |                                        |                                                  |        |
| Tornesello<br>et al. (1997) | Southern blot<br>e PCR                          | Amostras de<br>câncer<br>peniano<br>(13)  | 5                                  |                                           |     | Integração (4)<br>80                                          |                                        |                                                  |        |

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

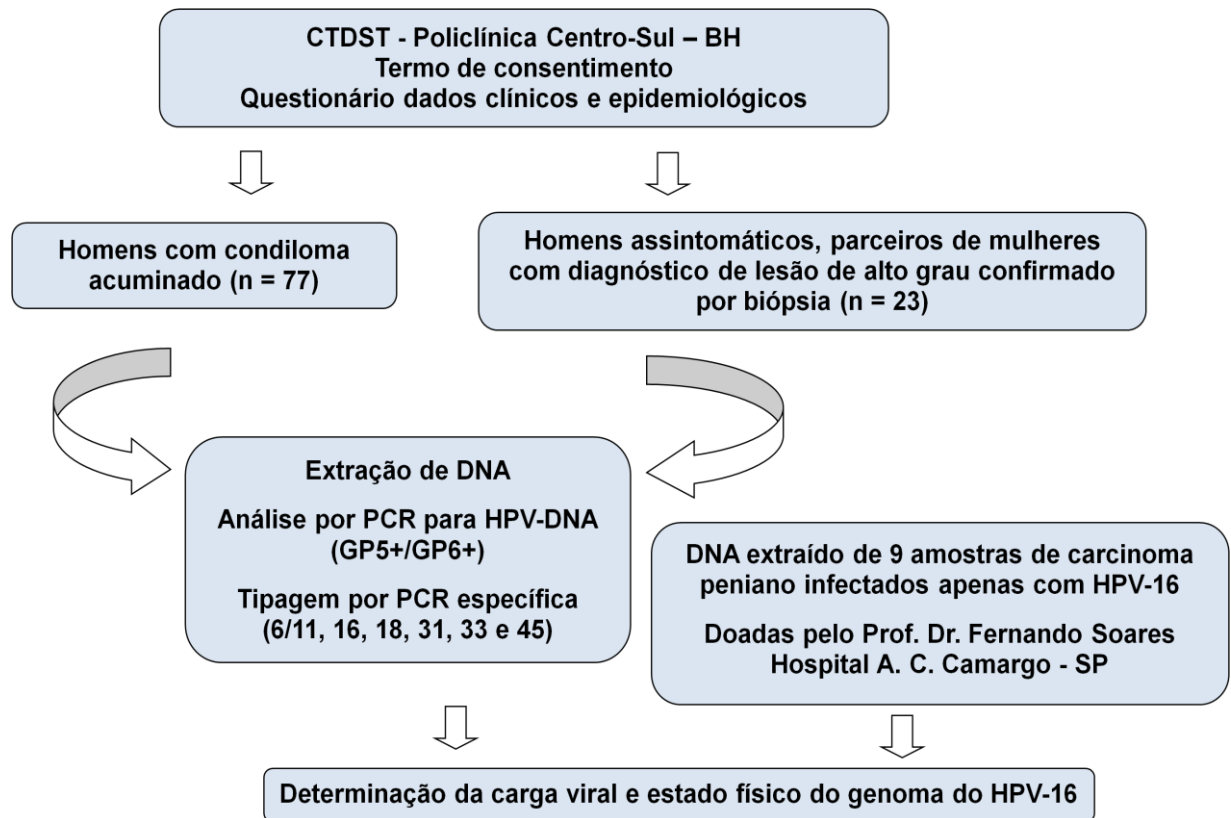
#### 3.1 População estudada

*Neste estudo foram incluídos 100 pacientes do sexo masculino que procuraram atendimento na Policlínica de Atendimento Médico da região Centro-Sul - Centro de Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis (CTDST) da Prefeitura de Belo Horizonte, situada à Rua Paraíba 890, Savassi, no período de Agosto de 2010 a Março de 2012. Os critérios de inclusão de pacientes utilizados neste estudo foram:*

- 1) Pacientes assintomáticos que foram encaminhados ao CTDST para avaliação diagnóstica, cujas parceiras eram portadoras de infecção por HPV associada a lesão escamosa intra-epitelial de alto grau, confirmada por biópsia;*
- 2) Pacientes que apresentavam condiloma acuminado e que foram encaminhados ao CTDST para iniciar o tratamento. Foram excluídos deste trabalho os pacientes cujo tratamento de condiloma acuminado já havia iniciado.*

*Todos os pacientes foram esclarecidos sobre a participação na pesquisa por Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1). Todos os homens, no momento da primeira coleta, responderam a um questionário (Apêndice 2). Os dados sobre recidiva de condiloma acuminado foram coletados por meio de consulta ao prontuário.*

*Neste estudo, foram também avaliadas 9 amostras de carcinoma peniano contendo DNA do HPV-16, doadas pelo professor Fernando Soares do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo de São Paulo. Nestas amostras, foram determinados os valores de carga viral e da relação E2/E6 do HPV-16, os quais foram empregados para avaliação da metodologia molecular e também como referência de padrão destes parâmetros nos casos de câncer peniano. O delineamento experimental encontra-se representado na figura 6. Foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Minas Gerais e registrado com o número 0088.0.410.203-09 e também aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte e registrado com o número 0088.0.410.203-09A (Anexos 1 e 2).*

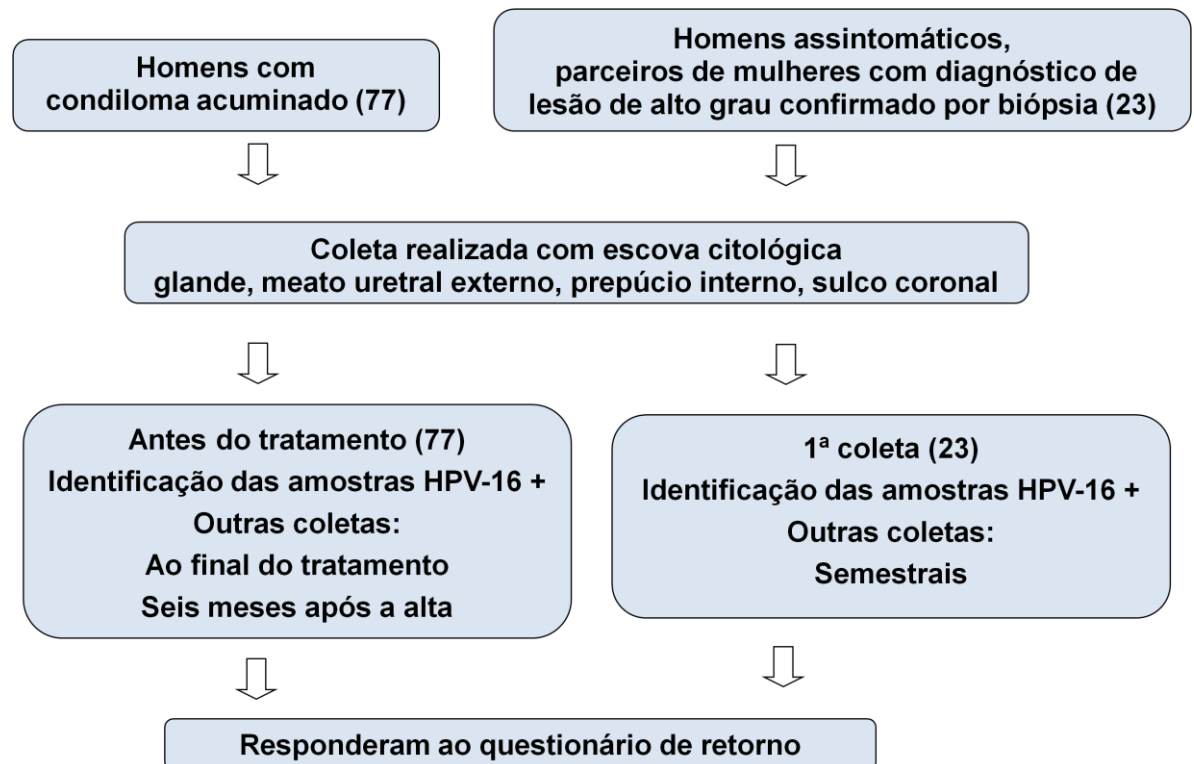
**Figura 6**

*Fluxograma descrevendo a população estudada e a metodologia usada na investigação da carga viral e do estado físico do genoma do HPV-16.*

### 3.2 Coleta do Material

*A coleta das amostras foi realizada com uma escova citológica (cytobrush) nas regiões da glândula, meato uretral externo e prepúcio, na parede interna e sulco coronal. A escova contendo o material foi colocada em um tubo com solução salina estéril. Essa coleta foi realizada pela doutoranda, auxiliada por aluno de iniciação científica. Foram realizadas coletas sequenciais, a cada seis meses, em pacientes assintomáticos. Para os pacientes com condiloma acuminado a coleta foi realizada antes, ao final do tratamento e cerca de seis meses após a alta (Fig. 7). A cada retorno o participante respondeu um novo questionário (Apêndice 3).*

Figura 7



*Fluxograma descrevendo a metodologia de coleta e as coletas sequenciais previstas usadas na investigação da carga viral e do estado físico do genoma do HPV-16.*

### 3.3 Análise Molecular

#### 3.3.1 Identificação e tipagem do HPV

A análise molecular foi realizada a partir de uma alíquota de 1 µL, retirada da amostra contendo o DNA extraído. Inicialmente realizou-se a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificação de fragmento do gene da β-globina humana, que funciona como controle interno da reação, verificando a integridade do DNA extraído. Nessa PCR, foram utilizados os oligonucleotídeos PC03 e PC04 (SAIKI et al., 1988). Posteriormente foram feitas a pesquisa de HPV e a identificação dos HPVs tipos 6/11, 16, 18, 31, 33 e 45, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para estes vírus (de RODA HUSMAN et al., 1995; GRCE et al., 1997; HUANG et al., 2004) (Quadro 4).

**Quadro 4** - Sequencia de bases dos oligonucleotídeos que foram utilizadas nas reações de PCR

| Produto (pb)            | Oligonucleotídeos | Seqüência                                                                    |
|-------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| $\beta$ - globina (100) | PC03              | 5'ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC3'                                               |
|                         | PC04              | 5'CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC3'                                               |
| HPV (150)<br>região L1  | GP5+              | 5'TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC3'                                           |
|                         | GP6+              | 5'GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C3'                                        |
| HPV-6/11 (301)          |                   | 5'TAC ACT GCT GGA CAA CAT GC3'<br>5'GTG CGC AGA TGG GAC ACA C3'              |
| HPV-16 (152)            |                   | 5'TGC TAG TGC TTA TGC AGC AA3'<br>5'ATT TAC TGC AAC ATT GGT AC3'             |
| HPV-18 (216)            |                   | 5'AAG GAT GCT GCA CCG GCT GA3'<br>5'CAC GCA CAC GCT TGG CAG GT3'             |
| HPV-31 (514)            |                   | 5'ATG GTG ATG TAC ACA ACA CC3'<br>5'GTA GTT GCA GGA CAA CTG AC3'             |
| HPV-33 (455)            |                   | 5'ATG ATA GAT GAT GTA ACG CC3'<br>5'GCA CAC TCC ATG CGT ATC AG3'             |
| HPV-45 (296)            |                   | 5'TTT GTT GGC ATA ATC AGT TGT TTG3'<br>5'CAA AAC GAT ATG TAT CCA CCA AAC T3' |

Para a realização da extração, as células contidas nos tubos de coleta foram homogeneizadas e a escova citológica retirada. A extração foi realizada utilizando-se kits de extração de DNA da G&E (EUA). As amostras foram concentradas em centrífuga à vácuo até o volume final de cerca de 100  $\mu$ L e levados à refrigeração.

Foram utilizados os métodos de identificação e tipagem dos HPVs de acordo com técnicas já padronizadas no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade Farmácia, UFMG. As quantidades dos reagentes padronizados variam para cada reação e estão descritas no Quadro 5 para um volume de reação de 10  $\mu$ L.

**Quadro 5 – Reagentes utilizados no preparo de 10  $\mu$ L de reação de PCR .**

| Reagentes<br>(concentração)          | Unidade | PCR |        |        |        |        |        |          |
|--------------------------------------|---------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
|                                      |         | HPV | HPV-16 | HPV-18 | HPV-31 | HPV-33 | HPV-45 | HPV-6/11 |
| Tampão I B<br>(10 x)                 | $\mu$ L | 1   | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 1        |
| DNTPs<br>(2 mM) <sup>1</sup>         | mM      | 0,2 | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2      |
| Primer Reverse<br>(10 pmol/ $\mu$ L) | pmol    | 5   | 5      | 5      | 5      | 5      | 5      | 2,5      |
| Primer Forward<br>(10 pmol/ $\mu$ L) | pmol    | 5   | 5      | 5      | 5      | 5      | 5      | 2,5      |
| Taq<br>(5 UI/ $\mu$ L)               | UI      | 1   | 1      | 0,5    | 0,5    | 0,5    | 1      | 0,5      |
| DNA                                  | $\mu$ L | 1   | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 1        |
| H <sub>2</sub> O qsp 10 $\mu$ L      | $\mu$ L | 5,8 | 5,8    | 5,9    | 5,9    | 5,9    | 5,8    | 6,4      |

1 Concentração da solução estoque de cada nucleotídeo (adenina, guanina, citosina e timina) misturados em uma mesma solução.

Em geral os testes foram iniciados com a quantidade de 1  $\mu$ L. Caso negativo, a quantidade de DNA foi reduzida ou aumentada. Foram testados os volumes de 3  $\mu$ L do DNA extraído e 2  $\mu$ L de uma diluição de 1:10. Não havendo positividade nessas três tentativas, a amostra foi considerada negativa.

As reações de PCR foram realizadas em termocicladores e suas etapas estão descritas no Quadro 6. As etapas de extração do DNA, preparo da solução com os reagentes para a reação de PCR, adição do DNA à solução de reagentes e eletroforese dos produtos de PCR foram realizadas em ambientes diferentes para evitar contaminação.

Em todas as reações de PCR foram incluídos controles positivo (amostras sabidamente positivas obtidas no próprio laboratório por testes aleatórios ou do Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico – NUPAD) e branco, o qual contém todos os reagentes, exceto o DNA. Os produtos da PCR juntamente com padrão de peso molecular (100 pb), foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corados pelo nitrato de prata.

**Quadro 6 – Condições das reações de PCR.**

| <i>Etapas da reação de PCR</i> |                             |                             |                             |                      |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|
| <i>Oligonucleotídeos</i>       | <i>Desnaturação</i>         | <i>Anelamento</i>           | <i>Extensão</i>             | <i>Nº. de ciclos</i> |
| <i>PC03/ PC04</i>              | <i>94°C<br/>1 minuto</i>    | <i>55°C<br/>1 minuto</i>    | <i>72°C<br/>1 minuto</i>    | <i>05</i>            |
|                                | <i>94°C<br/>1 minuto</i>    | <i>53°C<br/>1 minuto</i>    | <i>72°C<br/>1 minuto</i>    | <i>30</i>            |
| <i>GP5+/ GP6+</i>              | <i>95°C<br/>1 minuto</i>    | <i>45°C<br/>1 minuto</i>    | <i>72°C<br/>1 minuto</i>    | <i>05</i>            |
|                                | <i>95°C<br/>1 minuto</i>    | <i>42°C<br/>1 minuto</i>    | <i>72°C<br/>1 minuto</i>    | <i>35</i>            |
| <i>HPV-16</i>                  | <i>94°C<br/>30 segundos</i> | <i>57°C<br/>30 segundos</i> | <i>72°C<br/>30 segundos</i> | <i>40</i>            |
| <i>HPV-18</i>                  | <i>94°C<br/>30 segundos</i> | <i>66°C<br/>30 segundos</i> | <i>72°C<br/>30 segundos</i> | <i>05</i>            |
|                                | <i>94°C<br/>30 segundos</i> | <i>64°C<br/>30 segundos</i> | <i>72°C<br/>30 segundos</i> | <i>35</i>            |
| <i>HPV-31</i>                  | <i>94°C<br/>30 segundos</i> | <i>54°C<br/>30 segundos</i> | <i>72°C<br/>1 minuto</i>    | <i>40</i>            |
| <i>HPV-33</i>                  | <i>94°C<br/>30 segundos</i> | <i>57°C<br/>30 segundos</i> | <i>72°C<br/>1 minuto</i>    | <i>05</i>            |
|                                | <i>94°C<br/>30 segundos</i> | <i>55°C<br/>30 segundos</i> | <i>72°C<br/>1 minuto</i>    | <i>35</i>            |
| <i>HPV-45</i>                  | <i>94°C<br/>30 segundos</i> | <i>59°C<br/>30 segundos</i> | <i>72°C<br/>1 minuto</i>    | <i>40</i>            |
| <i>HPV-6/11</i>                | <i>94°C<br/>30 segundos</i> | <i>68°C<br/>30 segundos</i> | <i>72°C<br/>1 minuto</i>    | <i>05</i>            |
|                                | <i>94°C<br/>30 segundos</i> | <i>65°C<br/>30 segundos</i> | <i>72°C<br/>1 minuto</i>    | <i>35</i>            |

### 3.3.2 Plasmídeos pE6, pHPV-16 e célula SiHa

Um fragmento de 614 bps da janela de leitura (ORF -Open reading frame) do gene E6 do HPV-16 (nucleotídeo 22 a 617; GenBank, acesso número K02718) foi amplificado a partir do DNA de células SiHa doada pela professora Dr<sup>a</sup>. Luisa Lina Villa, chefe do grupo de virologia do Instituto Ludwig para pesquisa do Câncer,

Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo, Brasil. Foram utilizados os iniciadores 5'-CGCGGATCCAACTAAGGGCGTAACCGAAAT-3' e 5'-CCGAAGCTTGTCTCTGGTTGCAAATCTAAC-3', baseado nas sequencias descritas por Cricca et al. (2007). Esse fragmento foi clonado no plasmídeo pGEM-T easy, obtendo-se o plasmídeo pE6, de acordo com as condições experimentais descritas no Quadro 7.

**Quadro 7** – Reagentes utilizados no preparo de 5 µL de reação de ligação para construção do plasmídeo pE6.

| Reagentes (quantidade/concentração) | Volume (µL) |
|-------------------------------------|-------------|
| Tampão de ligação rápida (2 x)      | 2,5         |
| pGEM-T easy vector (50 ng)          | 0,5         |
| T4 DNA Ligase (3 unidades/ µL)      | 0,5         |
| Produto de PCR (50 ng/ µL)          | 1,0         |
| Água mili Q                         | 0,5         |

Os reagentes foram misturados e a reação incubada a 4°C, overnight (aproximadamente 16 horas) obtendo-se assim o plasmídeo pE6. Esse plasmídeo foi utilizado para a determinação da carga viral e quantificação do gene E6 para a obtenção da relação E2/E6 utilizada na avaliação do estado físico do DNA-HPV-16.

O plasmídeo contendo o genoma completo do HPV-16 (pHPV16) foi gentilmente cedido pela Dr<sup>a</sup>. Alison McBride (DNA Tumor Virus Section - Laboratory of Viral Diseases NIAID - National Institute of Allergy and Infectious Diseases - National Institutes of Health - Bethesda – EUA). Esse plasmídeo foi utilizado na quantificação do gene E2 para a obtenção da relação E2/E6 utilizada na avaliação do estado físico do DNA-HPV-16.

Células quimicamente competentes de *Escherichia coli* DH5-α foram transformadas isoladamente com ambos os plasmídeos. Foram adicionados 2µL do produto de clonagem em 30 µL de bactérias, em tubos devidamente acondicionados em gelo. Logo após realizou-se o choque térmico a 42°C, por 1,5 minutos voltando imediatamente essas células para o gelo por mais 2 minutos. Posteriormente foi adicionado 500µL de meio LB (Luria-Bertani) aos tubos de transformação e

*incubados a 37°C por 1 hora. Após centrifugação, 400µL de meio foram descartados e os 100µL restantes plaqueados em meio LB com ampicilina a 37°C, overnight. Os clones transformantes foram selecionados e as bactérias amplificadas. Uma PCR de colônia foi realizada para a seleção dos clones que receberam o plasmídeo pE6, utilizando-se os mesmos iniciadores que amplificaram o inserto clonado. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit de purificação de DNA plasmidial Wizard Maxipreps (Promega, EUA) e quantificado em equipamento Nanoview (G&E, EUA).*

*Células SiHa (fibroblasto humano infectado com HPV-16 na forma integrada) foram cultivadas em meio Dulbecco modificado, em estufa com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C. O DNA dessas células foi extraído utilizando o kit da G&E e quantificado em equipamento Nanoview (G&E, EUA). Esse DNA foi utilizado como controle positivo nas PCRs de β-globina, HPV geral e HPV-16, na construção de curvas padrão para a quantificação do gene de β-actina utilizado como gene endógeno na determinação de carga viral e utilizado também na padronização da PCR em tempo real do gene E6 (como amostra positiva) e gene E2 (como amostra negativa).*

### **3.3.3 Determinação da carga viral**

*Inicialmente, os oligonucleotídeos para os genes da Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (GRAVITT et al., 2007) e da β-actina humana (WANG-JOHANNING et al., 2002) (Quadro 8) foram testados quanto à sensibilidade e especificidade. Os iniciadores que melhor se adequaram às condições experimentais foram selecionados e o método de PCR em tempo real SYBR Green padronizado. Para a determinação da carga viral, foi padronizado também a PCR em tempo real para o gene E6, utilizando os oligonucleotídeos descritos por Cricca et al. (2007) (Quadro 8).*

*Curvas padrão foram estabelecidas pela amplificação e quantificação do gene E6 e do gene endógeno escolhido. Para tal foram preparadas curvas de amplificação com diluições sequenciais de 10<sup>7</sup> a 10 cópias de plasmídeo pE6 e de 3x10<sup>2</sup> a 10<sup>2</sup>ng de DNA celular (DNA de células SiHa) respectivamente.*

**Quadro 8 – Iniciadores testados na padronização da PCR em tempo real.**

| <i>Iniciadores<br/>(Tamanho do fragmento amplificado)</i>                         | <i>Sequencia</i>                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>β-actina</b><br>(295 pbs)                                                      | 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'<br>5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3' |
| <b>GAPDH</b><br>(288 pbs)                                                         | 5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3'<br>5'-CATGAGTCCTTCCACGATACCAA-3'        |
| <b>E6</b> (Cricca et al., 2007)<br>(130 pbs)                                      | 5'-AAAGCCACTGTGTCCTGAAGA-3'<br>5'-CTGGGTTTCTCTACGTGTTCT-3'         |
| <b>E2</b> (Gravitt et al., 2003)<br><b>Região de dobradiça</b> (184 pbs)          | 5'-TTTAGCAGCAACGAAGTATCC-3'<br>5'-AGTCTCTGTGCAACAACCTTAG-3'        |
| <b>E2</b> (Arias-Pulido et al., 2006)<br><b>Região de aminoterminal</b> (281 pbs) | 5'-GTGTGTCAGGACAAAATACTAACA-3'<br>5'-AAATACACTTCAAGGCTAACGTC-3'    |

A conversão de nanogramas de DNA plasmidial para número de cópias foi realizada pela utilização da fórmula descrita abaixo (WHELAN et al., 2003):

$$\text{n}^{\circ} \text{ de cópias/ } \mu\text{L} = \frac{\text{q/ } \mu\text{L de DNA}}{\text{tamanho do plasmídeo em pb} \times 660} \times 6,022 \times 10^{23}$$

O valor  $6,022 \times 10^{23}$  corresponde ao número de Avogrado e o valor de 660 é obtido pelo peso médio dos nucleotídeos (330 Daltons) multiplicado por 2, por se tratar de fita dupla (WHELAN et al., 2003).

Os valores de “ciclo threshold” obtidos pela curva de amplificação foram plotados versus quantidade (número de cópias para o gene E6 ou ng de DNA total para gene endógeno) para a construção de curvas padrões. Todos os cálculos realizados para a construção destas curvas foram realizados pelo programa de PCR em tempo real da Applied Biosystems.

A amplificação do gene endógeno foi empregada para a normalização dos valores de carga viral, expressa em número de cópias de E6/ ng de DNA celular total sendo esta obtida pela fórmula:

$$\text{Carga Viral} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cópias de E6}}{\text{ng de DNA total}}$$

(cópias de HPV/ ng de DNA total)

Posteriormente estes valores foram convertidos em número de cópias de E6/célula assumindo-se que 1ng de DNA total corresponde a, aproximadamente, 150 células (LEYVA & KELLEY, 1974).

### 3.3.4 Determinação da razão E2/E6

Com o objetivo de avaliar o estado físico do DNA viral em relação à célula hospedeira (integrado e/ou sob forma epissomal) foi determinada a relação E2/E6, conforme descrito em Cricca et al. (2007). Para a determinação desta relação, o gene E2 foi amplificado na região de dobradiça (Quadro 8) que corresponde a 78,4% das quebras ocorridas nesse gene (ARIAS-PULIDO et al., 2006). Nos casos onde a integração do DNA-HPV-16 ao genoma do hospedeiro não foi detectada, ou seja, onde E2 encontra-se íntegro, utilizou-se outro par de iniciadores cuja amplificação ocorre na região codificante da extremidade animoterminal da proteína E2 (Quadro 8). O uso desse segundo par de oligonucleotídeos aumenta a sensibilidade do teste, reduzindo o erro da não determinação da integração de 16% para 5% (ARIAS-PULIDO et al., 2006). Cópias de ambos os genes foram quantificadas e seus valores de ciclo threshold plotados versus número de cópias do gene em curvas padrões obtidas conforme descrito acima e a relação E2/E6 calculada pela razão do número de cópias de cada gene.

Foram consideradas três categorias para avaliação da relação E2/E6: epissomal, mista (onde as formas epissomal e integrada coexistem) e integrada. Os valores da relação E2/E6 para cada categoria foram determinados utilizando-se a quantificação dos genes E2 e E6 em amostras conhecidas e predeterminadas. Foram preparadas amostras nas concentrações de  $10^7$  a 10 cópias de plasmídeos (pHPV16 e pE6) nas proporções descritas no Quadro 9. Todos os testes foram realizados em triplicata. As amostras correspondentes à forma epissomal continham apenas plasmídeo HPV-16 onde os genes E2 e E6 encontram-se íntegros. Outras amostras com misturas de plasmídeo HPV-16 e plasmídeo E6 (plasmídeo contendo apenas o gene E6) representando a forma mista e outras amostras contendo apenas o plasmídeo E6 representando a forma integrada (CRICCA et al.; 2007).

**Quadro 9** – Amostras utilizadas na categorização da relação E2/E6.

| <i>Amostras<br/>Misturas pHPV16 – pE6 (%)</i> | <i>Categorização</i> |
|-----------------------------------------------|----------------------|
| <i>100 – 0</i>                                | <i>Epissomal</i>     |
| <i>80 – 20</i>                                | <i>Mista</i>         |
| <i>60 – 40</i>                                | <i>Mista</i>         |
| <i>40 – 60</i>                                | <i>Mista</i>         |
| <i>20 – 80</i>                                | <i>Mista</i>         |
| <i>0 – 100</i>                                | <i>Integrado</i>     |

### 3.4 Análise estatística

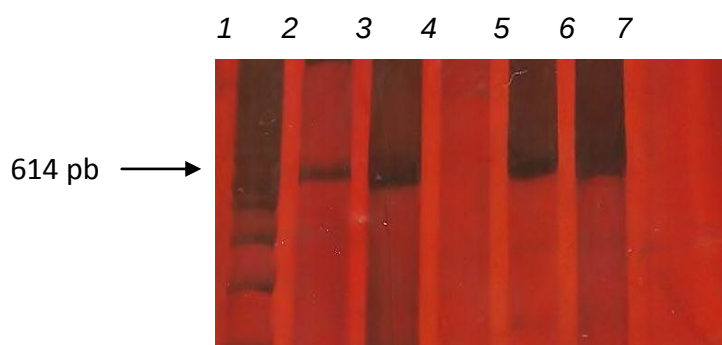
Os dados foram analisados usando-se o programa SPSS versão 13.0. Os níveis de significância foram verificados pelo teste qui-quadrado de Pearson assintótico e de Fisher exato, na análise de associação entre os dados clínicos-epidemiológicos com presença do HPV-16. Na comparação de cargas virais com o estado físico do DNA-HPV-16, presença de condiloma acuminado e múltiplas infecções, recidivas e resistência ao tratamento, e outras variáveis utilizou-se os testes Mann Whitney na comparação de dois grupos e Teste Kruskal Wallis na comparação de três ou mais grupos. Diferenças significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Construção do plasmídeo pE6

O sucesso da construção do plasmídeo pE6 foi avaliado ao submetê-lo à mesma reação de PCR utilizada na amplificação do fragmento clonado como inserto. Foram também realizadas PCRs para amostras contendo DNA de células SiHa (fibroblasto humano com HPV-16 integrado), amostra cervical conhecida onde o HPV-16 está na forma epissomal, plasmídeo pGEM vazio e plasmídeo pHPV16 (contém todo o genoma do HPV-16) (Figura 8).

**Figura 8**



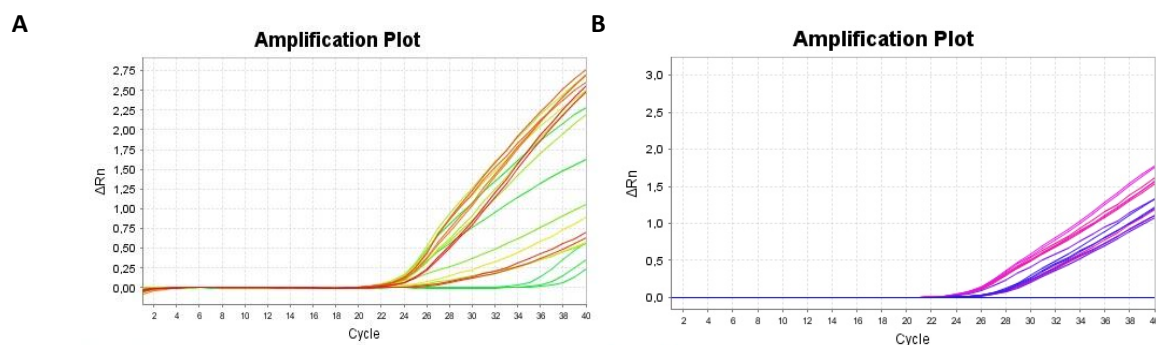
Eletróforese em gel de poliacrilamida de experimento de avaliação do plasmídeo pE6 obtido. 1ª. Canaleta: padrão de peso molecular 100 pb, Invitrogen; 2ª. Canaleta: amostra cervical conhecida (infetada por HPV-16 epissomal); 3ª. Canaleta: SiHa (amostra de fibroblasto humano infectado por HPV-16, forma integrada); 4ª. Canaleta: pGEM, 5ª. Canaleta: pE6, 6ª. Canaleta: pHPV16; 7ª. Canaleta: Branco.

### 4.2 Padronização dos métodos de PCR em tempo real

Os iniciadores descritos por Cricca et al. (2007), para o gene de  $\beta$ -actina, foram os que mostraram melhor sensibilidade (maior intensidade de fluorescência para a mesma quantidade de DNA testada, quando comparada ao teste de GAPDH) e melhor se adequaram às condições para a reação de PCR em tempo real do laboratório de biologia molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, sendo por isso escolhidos para amplificação do gene endógeno a ser empregado na normalização da PCR em tempo real, como apresentado na Figura 9.

As condições utilizadas nas reações de PCR em tempo real padronizadas para E6, E2, regiões de dobradiça e aminoterminal, e  $\beta$ -actina estão descritas nos Quadros 10 e 11.

Figura 9



Gráficos representativos das padronizações das PCRs em tempo real para os genes endógenos  $\beta$ -actina (A) e GAPDH (B). Gráficos obtidos durante o teste de concentração dos primers.

Quadro 10 – Reagentes utilizados no preparo de 10  $\mu$ L de reação de PCR.

| PCR                                      |                            |               |                           |                               |
|------------------------------------------|----------------------------|---------------|---------------------------|-------------------------------|
| Reagentes<br>(concentração)              | $\beta$ -actina<br>$\mu$ L | E6<br>$\mu$ L | E2 (dobradiça)<br>$\mu$ L | E2 (aminoterminal)<br>$\mu$ L |
| Tampão SYBR-Green* (2 x)                 | 12,5                       | 12,5          | 12,5                      | 12,5                          |
| Primer “ANTI-SENSE”<br>(5 pmol/ $\mu$ L) | 4,5                        | 1,5           | 1,5                       | 1,5                           |
| Primer “SENSE”<br>(5 pmol/ $\mu$ L)      | 1,5                        | 1,5           | 1,5                       | 1,5                           |
| DNA                                      | 2,5                        | 2,5           | 2,5                       | 2,5                           |
| H2O qsp 25 $\mu$ L                       | 4,0                        | 7,0           | 7,0                       | 7,0                           |

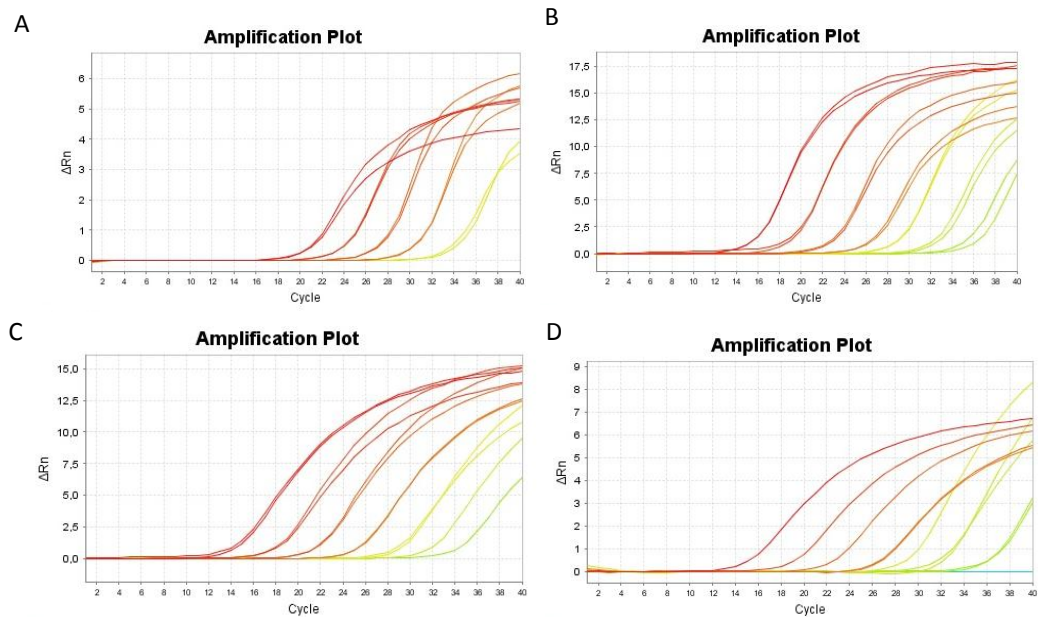
\* Tampão SYBR Green/ Rox qPCR Master Mix: Maxima Hot Start Taq DNA polymerase, Maxima SYBR Green qPCR Buffer, SYBR Green I, ROX passive reference dye, dATP, dGTP, dCTP e dUTP.

Quadro 11 – Condições das reações de PCR

| Etapas da reação de PCR                                             |                  |                      |               |
|---------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------|---------------|
| Oligonucleotídeos                                                   | Desnaturação     | Anelamento/ Extensão | Nº. de ciclos |
| <b><math>\beta</math>-actina</b><br>$\beta$ - act 1/ $\beta$ -act 2 | 94°C<br>1 minuto | 70°C<br>1 minuto     | 40            |
| <b>E6</b><br>E6 5/ E6 6                                             | 94°C<br>1 minuto | 61°C<br>1 minuto     | 40            |
| <b>E2 (dobradiça)</b><br>E2 7/ E2 8                                 | 94°C<br>1 minuto | 62°C<br>1 minuto     | 40            |
| <b>E2 (aminoterminal)</b><br>E2 F10/ E2 R10                         | 94°C<br>1 minuto | 60°C<br>1 minuto     | 40            |

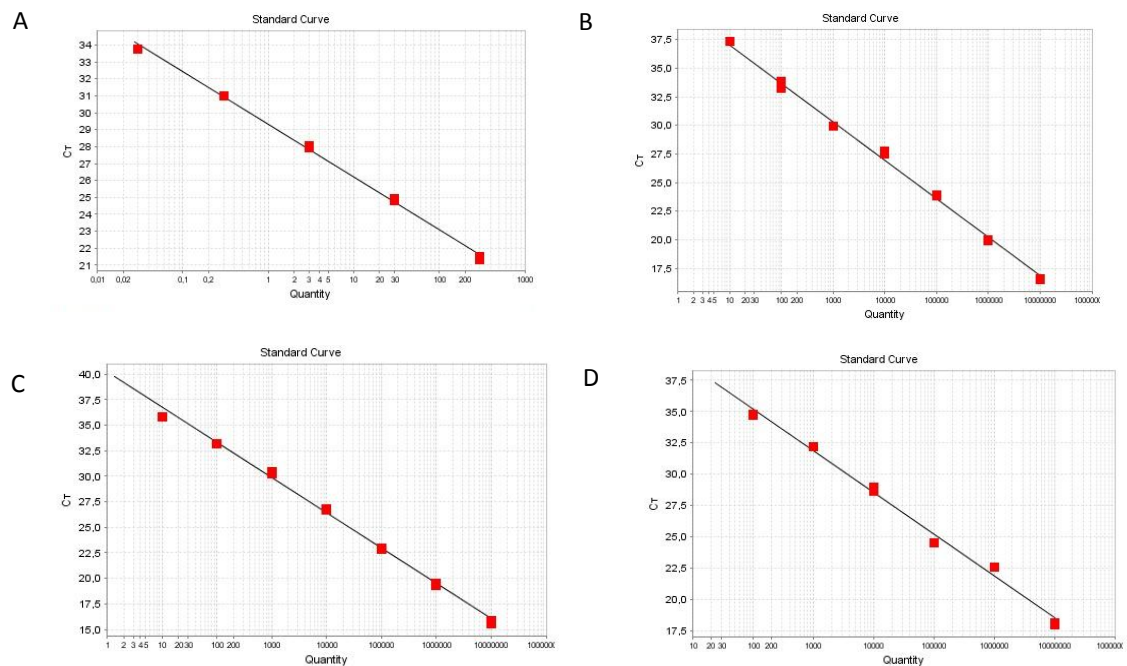
Alguns dos gráficos que exemplificam todas as reações de PCR em tempo real padronizadas e utilizadas durante este estudo (genes E6, E2 região de dobradiça e região amino terminal e  $\beta$ - actina) são mostrados nas Figuras 10 a 12.

Figura 10



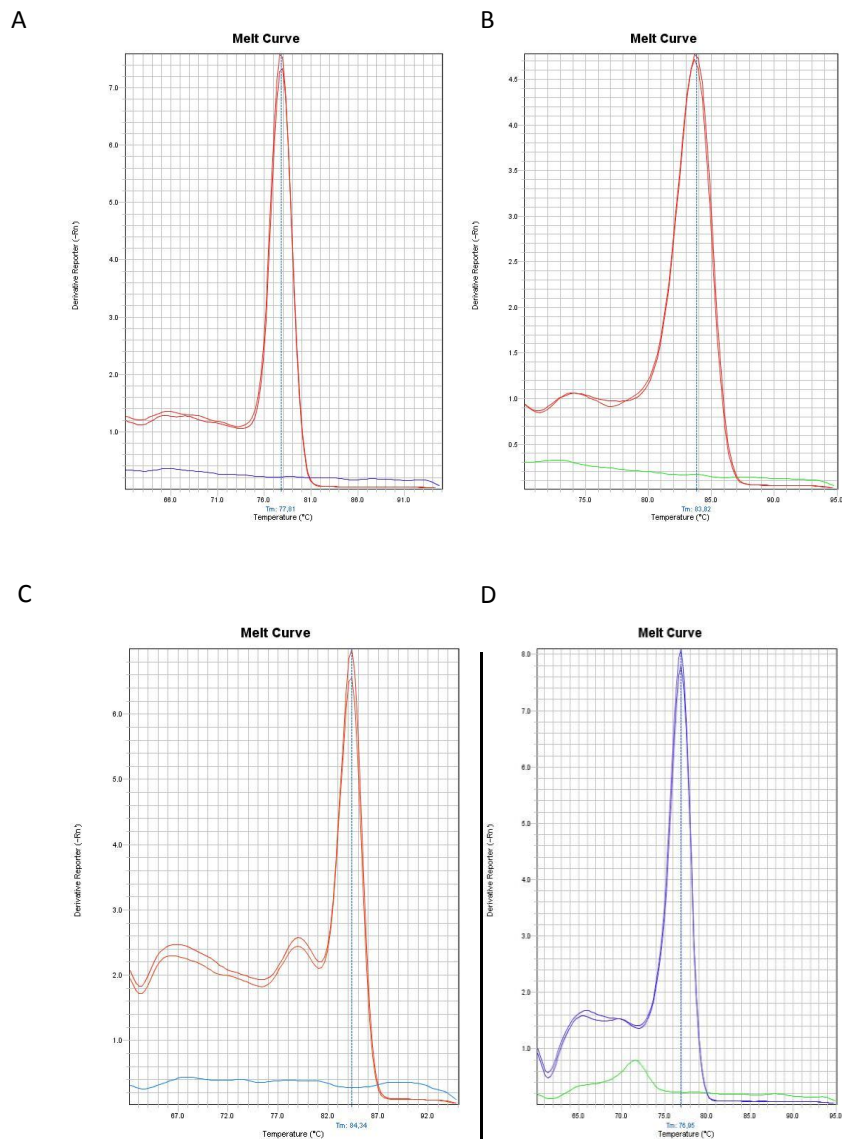
Curva de amplificação: Gráfico obtido pela plotação dos valores de ciclo de PCR vs fluorescência. Cada curva sigmóide representa uma amostra da curva padrão e suas replicas.  $\beta$ -actina (A) – Curva padrão  $10^2$  a  $10^{-2}$  ng de DNA total, gene E6 (B) e gene E2 região de dobradiça (C) e amino terminal (D). Nestes últimos três gráficos, a curva padrão foi construída nas concentrações de  $10^7$  a 10 cópias dos respectivos genes, E6 e E2.

Figura 11



Curva padrão: Construída a partir da curva de amplificação. Determinado o threshold, associa-se o ciclo threshold encontrado com a respectiva quantidade e constrói-se a curva padrão abaixo por regressão linear dos pontos obtidos. Gráfico quantidade vs CT (ciclo threshold). Cada ponto vermelho representa uma amostra da curva padrão assim obtida.  $\beta$ -actina (A), gene E6 (B) e gene E2 região de dobradiça (C) e amino terminal (D).

Figura 12



Curva melt: derivação repórter x temperatura. Curva obtida para controle de qualidade da reação. A existência de um único pico garante ausência de bandas inespecíficas e o branco sem picos garante a ausência de dímeros de primer.  $\beta$ -actina (A), gene E6 (B) e gene E2 região de dobradiça (C) e amino terminal (D).

Todas as curvas foram construídas pelo programa de PCR em tempo real da Applied biosystems. A curva melt foi utilizada como controle de qualidade da reação, permitindo a avaliação da ocorrência de amplificações inespecíficas e dímeros de primers.

### 4.3 Determinação da relação E2/E6

Como referência para categorização das amostras em estudo, em relação ao estado físico do genoma HPV-16, foram conduzidos experimentos em que diferentes proporções de DNA pHPV16 e pE6 foram combinadas na mesma amostra. Os resultados compilados encontram-se nas Tabelas 1 e 2. Todos os testes foram realizados em triplicata e os valores descritos na Tabela 1 correspondem às médias observadas em amostras em concentrações que variaram de  $10^4$  a  $10^2$  cópias de plasmídeos. A categorização final encontra-se descrita na Tabela 2.

**Tabela 1** – Valores individuais médios da razão E2/E6 nas diferentes concentrações utilizadas para construção da categorização do estado físico HPV-16.

| Concentração<br>(nº. de cópias de<br>plasmídeos) | Valores das razões das misturas<br>pHPV16 (E2-epissomal) – pE6 (integrado) (%) |                  |                  |                  |                  |                  |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                                  | 0-100                                                                          | 20-80            | 40-60            | 60-40            | 80-20            | 100-0            |
| $10^4$                                           | 0                                                                              | 0,1655           | 0,3407           | 0,5306           | 0,7088           | 0,8253           |
| $10^3$                                           | 0                                                                              | 0,2322           | 0,4715           | 0,6771           | 0,8831           | 1,1641           |
| $10^2$                                           | 0                                                                              | 0,2434           | 0,3817           | 0,7581           | 0,8315           | 1,2523           |
| <b>média ± desvio</b>                            | <b>0</b>                                                                       | <b>0,21±0,04</b> | <b>0,40±0,07</b> | <b>0,66±0,12</b> | <b>0,81±0,09</b> | <b>1,08±0,23</b> |

**Tabela 2** – Amostras preparadas e utilizadas na categorização da relação E2/E6 e valores dessa relação determinados experimentalmente.

| Amostras<br>Misturas pHPV16 – pE6 (%) | Categorização | Valores médios da<br>relação E2/E6 |
|---------------------------------------|---------------|------------------------------------|
| 100 – 0                               | Epissomal     | $\geq 1,08$                        |
| 80 – 20                               | Mista         | $\geq 0,81$ e $< 1,08$             |
| 60 – 40                               | Mista         | $\geq 0,66$ e $< 0,81$             |
| 40 – 60                               | Mista         | $\geq 0,40$ e $< 0,66$             |
| 20 – 80                               | Mista         | $> 0$ e $< 0,40$                   |
| 0 – 100                               | Integrado     | 0                                  |

#### 4.4 Determinação da carga viral e do estado físico do genoma do HPV-16 em amostras de câncer peniano

Nove amostras de DNA extraídas de biópsias de carcinoma peniano, contendo somente HPV-16 foram analisadas e tiveram sua carga viral e o estado físico do DNA-HPV-16 determinados. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 3. Estes valores foram utilizados como referência para a carga viral e estado físico do DNA-HPV-16 para comparação com os resultados obtidos em amostras coletadas nesse trabalho.

**Tabela 3** – Valores de carga viral em cópias/célula e estado físico do DNA-HPV-16 das amostras de câncer peniano.

| Amostras                                | Carga viral<br>(cópias/célula) | Estado físico do HPV-16<br>(E2/E6)* |
|-----------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| 1                                       | 1,67                           | I (0)                               |
| 2                                       | 16,98                          | I (0)                               |
| 3                                       | 0,37                           | M 20-80 (0,038)                     |
| 4                                       | 20,36                          | I (0)                               |
| 5                                       | 60,03                          | I (0)                               |
| 6                                       | 3,80                           | I (0)                               |
| 7                                       | 13,29                          | I (0)                               |
| 8                                       | 11,82                          | M 20-80 (0,036)                     |
| 9                                       | 50,11                          | I (0)                               |
| <b>Mediana ± intervalo interquartil</b> | <b>13,29 ± 32,50</b>           |                                     |

\* I – Integrado, M 20-80 – 20% epissomal (pHPV16) e 80% integrado (pE6)

#### 4.5 Prevalência da infecção por HPV

Entre as 100 amostras de homens atendidos no CTDST, 87% apresentaram algum tipo de HPV. Considerou-se paciente portador de infecção pelo HPV aquele que apresentou resultado positivo em pelo menos uma das reações de PCR realizadas. A Tabela 4 mostra a prevalência da infecção por HPV na população estudada e a Figura 13 mostra alguns exemplos de géis de eletroforese em poliacrilamida obtidos na tipagem.

Dentre os homens que participaram dessa pesquisa, 38% (38/100) apresentaram DNA-HPV do tipo 16, 19% (19/100) apresentaram DNA-HPV-18, 9% (9/100) DNA-HPV-31, 3% (3/100) DNA-HPV-33, 76% (76/100) DNA-HPV-6/11 e 1% (1/100) DNA-HPV-45. Dentre os pacientes analisados, 54% apresentaram HPV de alto risco. Do total, 13% (13/100) dos pacientes foram negativos para a detecção de DNA-HPV. Em 3% (3/100) dos pacientes, detectaram-se DNA-HPV mediante a pesquisa com os oligonucleotídeos GP5+/GP6+, no entanto, não foi possível determinar o tipo viral com os oligonucleotídeos específicos empregados. Múltiplas infecções causadas por diferentes tipos de HPV foram encontradas em 48% (48/100) dos pacientes e os tipos de HPVs presentes nestas infecções estão descritos na tabela 5.

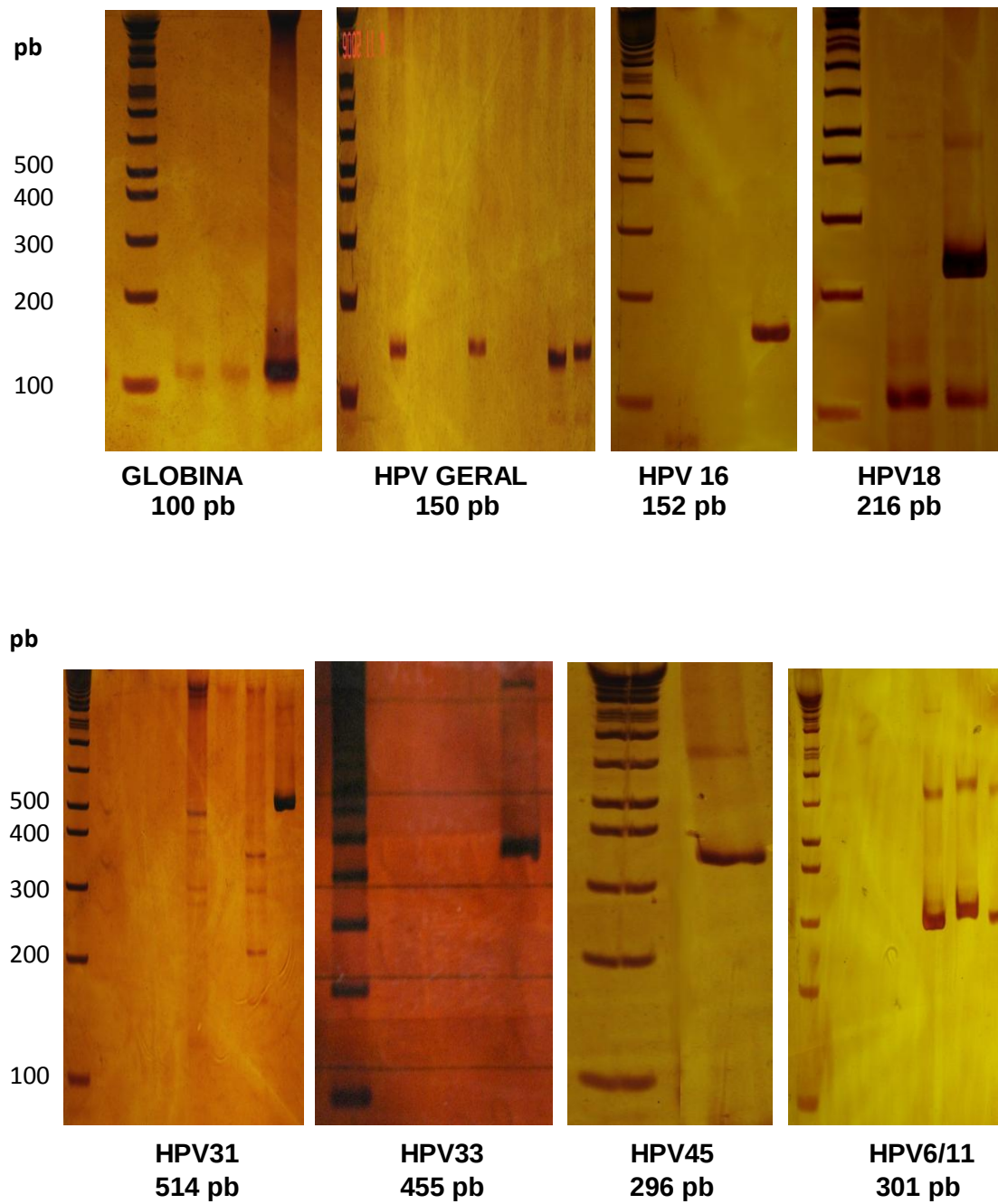
**Tabela 4 – Prevalência da infecção por HPV nas 100 amostras analisadas.**

| HPV                | Total (%) | Presença de condiloma |         |
|--------------------|-----------|-----------------------|---------|
|                    |           | Sim (%)               | Não (%) |
| 16                 | 38 (38)   | 32 (42)               | 6 (26)  |
| 18                 | 19 (19)   | 16 (21)               | 3 (13)  |
| 31                 | 9 (9)     | 7 (9)                 | 2 (9)   |
| 33                 | 3 (3)     | 2 (3)                 | 1 (4)   |
| 45                 | 1 (1)     | 1 (1)                 | 0       |
| 6/11               | 76 (76)   | 75 (97)               | 1 (4)   |
| Outros             | 3 (3)     | 2 (3)                 | 1 (4)   |
| Negativos          | 13 (13)   | 0                     | 13 (57) |
| Múltipla infecção  | 48 (48)   | 45 (58)               | 3 (13)  |
| Total de pacientes | 100       | 77                    | 23      |

**Tabela 5 – HPVs identificados em múltiplas infecções.**

| Pacientes | Grupo         | Múltiplas infecções |                  |
|-----------|---------------|---------------------|------------------|
|           |               | HPV-16 positivos    | HPV-16 negativos |
| 1         | Assintomático | 16, 33              |                  |
| 2         | Assintomático | 16, 6/11            |                  |
| 3         | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 4         | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 5         | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 6         | Assintomático | 16, 18              |                  |
| 7         | Condiloma     | 16, 18, 6/11        |                  |
| 8         | Condiloma     |                     | 31, 6/11         |
| 9         | Condiloma     |                     | 18, 31, 6/11     |
| 10        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 11        | Condiloma     | 16, 31, 6/11        |                  |
| 12        | Condiloma     | 16, 18, 6/11        |                  |
| 13        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 14        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 15        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 16        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 17        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 18        | Condiloma     |                     | 18, 6/11         |
| 19        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 20        | Condiloma     |                     | 18, 6/11         |
| 21        | Condiloma     |                     | 31, 6/11         |
| 22        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 23        | Condiloma     |                     | 31,33,6/11       |
| 24        | Condiloma     |                     | 33, 6/11         |
| 25        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 26        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 27        | Condiloma     | 18, 6/11            |                  |
| 28        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 29        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 30        | Condiloma     |                     | 18,6/11          |
| 31        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 32        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 33        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 34        | Condiloma     | 16, 31, 6/11        |                  |
| 35        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 36        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 37        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 38        | Condiloma     | 16, 6/11            |                  |
| 39        | Condiloma     | 16, 18, 45, 6/11    |                  |
| 40        | Condiloma     | 16, 18, 6/11        |                  |
| 41        | Condiloma     | 16, 18, 6/11        |                  |
| 42        | Condiloma     |                     | 18, 6/11         |
| 43        | Condiloma     |                     | 18, 6/11         |
| 44        | Condiloma     |                     | 18, 6/11         |
| 45        | Condiloma     |                     | 18, 6/11         |
| 46        | Condiloma     | 16, 18, 6/11        |                  |
| 47        | Condiloma     | 16, 18, 6/11        |                  |
| 48        | Condiloma     | 16, 31, 6/11        |                  |

Figura 13



*Amostras de géis de poliacrilamida corados pela prata, apresentando resultados de diferentes PCRs HPV específicas.*

*Nos homens assintomáticos, 56% (13/23) foram negativos para a pesquisa de HPV. A prevalência do HPV-16 foi de 26% (6/23) e do HPV-6/11 de 4% (1/23). Nestes pacientes, a prevalência de múltiplas infecções foi de 13% (3/23).*

*Nos pacientes portadores de condiloma acuminado (77), todos apresentaram algum tipo de HPV, sendo 97% (75/77) positivo para o HPV tipo 6/11 e 3% (2/77) para algum outro tipo de HPV não pesquisado. A prevalência do HPV-16 foi de 42% (32/77) e múltiplas infecções foram encontradas em 58% (45/77) destes pacientes.*

#### **4.6 Dados clínicos e epidemiológicos e sua correlação com a infecção por HPV**

*Os dados clínico-epidemiológicos foram registrados a partir da aplicação de questionário e seus resultados demonstrados na Tabela 5. A média de idade dos homens que participam dessa pesquisa foi de 32 anos, oscilando entre 19 e 62 anos.*

*Dos 100 homens envolvidos nesse estudo, 30 relataram história pregressa de condiloma acuminado. Destes, 47% (14/30) possuíam múltiplas infecções com HPV de alto risco, sendo 86% (12/14) destas com o HPV-16.*

*A maioria dos pacientes relatou não praticar sexo anal, não serem fumantes e não ser circuncidado (Tabela 6).*

**Tabela 6** – Frequência da infecção por HPV em amostras penianas detectada por PCR e sua associação com os dados clínico-epidemiológicos.

| Dados clínico-epidemiológicos              |       | Frequência (%)            |                          | Valor p            |
|--------------------------------------------|-------|---------------------------|--------------------------|--------------------|
|                                            |       | HPV baixo risco<br>(n=30) | HPV alto risco<br>(n=54) |                    |
| Idade (anos)                               | 18-29 | 14 (47)                   | 24 (44)                  | 0,845 <sup>1</sup> |
|                                            | ≥ 30  | 16 (53)                   | 30 (56)                  |                    |
|                                            | Média | 31                        | 30                       |                    |
| Parceira fixa                              | Não   | 10 (33)                   | 10 (19)                  | 0,127 <sup>1</sup> |
|                                            | Sim   | 20 (67)                   | 44 (81)                  |                    |
| Tempo médio de relacionamento/(anos)       |       | 5,1                       | 3,8                      |                    |
| Parceiros extraconjugais                   | Não   | 11 (55)                   | 30 (68)                  | 0,308 <sup>1</sup> |
|                                            | Sim   | 9 (45)                    | 14 (32)                  |                    |
|                                            | Média | 1,2                       | 3,6                      |                    |
| Uso de preservativo                        |       |                           |                          |                    |
| Com a parceira fixa                        | Sim   | 6 (20)                    | 8 (15)                   | 0,555 <sup>2</sup> |
|                                            | Não   | 24 (80)                   | 46 (85)                  |                    |
| Com a parceira extraconjugal ou esporádica |       |                           |                          |                    |
|                                            | Sim   | 21 (70)                   | 41 (76)                  | 0,554 <sup>1</sup> |
|                                            | Não   | 9 (30)                    | 13 (24)                  |                    |
| Presença de condiloma?                     | Sim   | 30 (100)                  | 9 (17)                   | 0,023 <sup>2</sup> |
|                                            | Não   | 0 (0)                     | 45 (83)                  |                    |
| Já teve condiloma antes?                   | Sim   | 11 (37)                   | 14 (26)                  | 0,302 <sup>1</sup> |
|                                            | Não   | 19 (63)                   | 40 (74)                  |                    |
| Intercurso anal                            | Sim   | 14 (47)                   | 16 (30)                  | 0,118 <sup>1</sup> |
|                                            | Não   | 16 (53)                   | 38 (70)                  |                    |
| Fumante                                    | Sim   | 11 (37)                   | 12 (22)                  | 0,155 <sup>1</sup> |
|                                            | Não   | 19 (63)                   | 42 (78)                  |                    |
| Circuncisão                                | Sim   | 2 (7)                     | 4 (7)                    | 0,635 <sup>2</sup> |
|                                            | Não   | 28 (93)                   | 50 (93)                  |                    |

1 Teste Qui-quadrado de Pearson assintótico

2 Teste Qui-quadrado de Fisher exato

#### 4.7 Determinação da carga viral

Os resultados de carga viral do HPV-16 obtidos nas análises de amostras penianas de 38 pacientes encontram-se descritos na Tabela 6. Observa-se ampla variação na carga viral, com valores oscilando entre 0,0003 a 5.386,15 cópias de E6/célula.

Os valores da carga viral foram comparados em relação às variáveis epidemiológicas dos participantes do estudo (idade, uso de camisinha, tabagismo, prática de sexo anal, presença de condiloma e múltiplas infecções). Ressalta-se que, para nenhum desses parâmetros, foi observada diferença significativa para a mediana da carga viral.

**Tabela 7** – Valores de carga viral do HPV-16 (cópias/célula) nas amostras analisadas e sua variação em relação à parametros epidemiologicos dos participantes do estudo

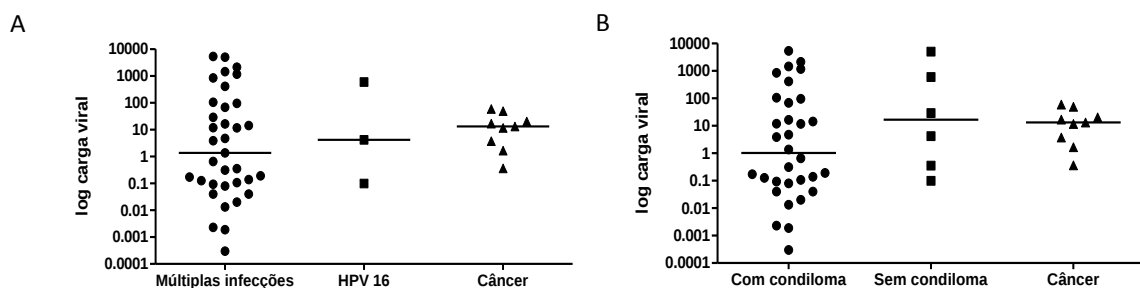
| Variáveis                                                            | Mediana da Carga viral $\pm$ intervalo interquartil (cópias/célula) | Variações (cópias/célula) | Valor p            |
|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| <i>Idade</i>                                                         |                                                                     |                           |                    |
| < 30 anos (20)                                                       | 7,95 $\pm$ 329,18                                                   | 0,002 a 2.151,19          | 0,421 <sup>1</sup> |
| $\geq$ 30 anos (18)                                                  | 0,25 $\pm$ 98,42                                                    | 0,0003 a 5.386,15         |                    |
| <i>Fumo</i>                                                          |                                                                     |                           |                    |
| Sim (8)                                                              | 0,12 $\pm$ 338,50                                                   | 0,002 a 1.456,55          | 0,410 <sup>1</sup> |
| Não (30)                                                             | 4,06 $\pm$ 75,21                                                    | 0,0003 a 5.386,15         |                    |
| <i>Sexo anal</i>                                                     |                                                                     |                           |                    |
| Sim (13)                                                             | 0,31 $\pm$ 16,77                                                    | 0,002 a 2.151,19          | 0,470 <sup>1</sup> |
| Não (25)                                                             | 11,67 $\pm$ 260,59                                                  | 0,0003 a 5.386,15         |                    |
| <i>Uso de camisinha com parceiras extra conjugais ou esporádicas</i> |                                                                     |                           |                    |
| Sim (29)                                                             | 3,89 $\pm$ 100,54                                                   | 0,0003 a 5.386,15         | 0,559 <sup>1</sup> |
| Não (9)                                                              | 0,17 $\pm$ 595,68                                                   | 0,01 a 5.027,22           |                    |
| <i>Presença de condiloma?</i>                                        |                                                                     |                           |                    |
| Sim (32)                                                             | 1,02 $\pm$ 89,25                                                    | 0,0003 a 5.386,15         | 0,280 <sup>1</sup> |
| Não (6)                                                              | 16,62 $\pm$ 1.703,92                                                | 0,1 a 5.027,22            |                    |
| <i>Múltiplas infecções</i>                                           |                                                                     |                           |                    |
| Sim (35)                                                             | 1,38 $\pm$ 96,24                                                    | 0,0003 a 5.386,15         | *                  |
| Não (3)                                                              | 4,23 $\pm$ 596,43                                                   | 0,1 a 596,53              |                    |

\* Impossível o cálculo devido ao tamanho da amostra (3). 1 Mann Whitney

Homens que possuíam infecções por HPV causadas por mais de um tipo de vírus ( $n=35$ ) apresentaram mediana da carga viral do HPV-16 menor que os infectados por apenas um tipo de vírus ( $n=3$ ) (1,38 vs 4,23 cópias de E6/ célula, respectivamente). Pacientes que relataram hábito de fumar e a prática de sexo anal, considerados como fatores de risco para a infecção por HPV, apresentaram menor mediana da carga viral do HPV-16 quando comparado aos pacientes não fumantes e não praticantes de sexo anal. Os pacientes que relataram uso de camisinha com parceiras extraconjugais ou esporádicas apresentaram maior mediana da carga viral do HPV-16 (Tabela 7). Apenas 30% dos pacientes analisados relataram história prévia de condiloma acuminado. Destes 87% (23/30) ainda possuem condiloma, e dentre estes, 56% (13/23) possuem múltiplas infecções. Homens que pela primeira vez apresentaram condiloma possuem carga viral média do HPV 16 maior que os que apresentaram história prévia de condiloma (2,64 vs 1,38 cópias de E6/ célula, não significativo).

A carga viral do HPV-16 em pacientes com condiloma acuminado mostrou-se mais baixa que nos pacientes que não possuíam esta lesão (1,02 vs 16,62 cópias de E6/ célula, respectivamente (Tabela 7). Os valores individuais de carga viral do HPV-16 categorizados em amostras com múltiplas infecções, em amostras de pacientes infectados somente pelo HPV-16 (A), com ou sem condiloma (B), e os valores das amostras de câncer peniano estão representados na Figura 14.

**Figura 14**



Valores logarítmicos de carga viral dos pacientes infectados por mais de um tipo viral (múltiplas infecções), somente pelo HPV-16 (A), com ou sem condiloma acuminado (B) e das amostras de câncer peniano. As linhas horizontais indicam os valores de mediana das amostras analisadas.

Não foram encontradas diferenças significativas entre a carga viral das amostras de câncer peniano (Tabela 3) e a carga viral das amostras penianas obtidas em homens assintomáticos ( $p= 0,955$ ), com condiloma ( $p= 0,242$ ) e com todas as amostras de pacientes sem neoplasia ( $p= 0,141$ ).

#### 4.8 Estado físico do DNA-HPV-16

Os resultados relativos à determinação do estado físico do DNA-HPV-16 obtidos nas análises de amostras penianas de 38 pacientes encontram-se descritos na Tabela 8.

**Tabela 8 – Estado físico DNA-HPV-16 e valores de carga viral (cópias/célula) de acordo com variáveis epidemiológicas dos participantes do estudo**

| Grupos (n)                        | Estado físico do HPV-16<br>(n) %                       | Carga viral<br>(cópias/ célula)                              | Valor de p |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------|
| Total (38)                        | Integrado (06) 16<br>Misto (28) 74<br>Epissomal (4) 10 | $0,22 \pm 4,35$<br>$11,82 \pm 338,38$<br>$0,12 \pm 3.770,41$ | $0,160^1$  |
| Presença de condiloma<br>sim (32) | Integrado (4) 13<br>Misto (25) 78<br>Epissomal (3) 9   | $0,05 \pm 3,57$<br>$11,67 \pm 260,53$<br>$0,11^*$            | $0,041^1$  |
| não (6)                           | Integrado (2) 33<br>Misto (3) 50<br>Epissomal (1) 17   | $2,29^*$<br>$29,02^*$<br>$5.027,22^*$                        | *          |
| Múltiplas infecções<br>sim (35)   | Integrado (5) 14<br>Misto (26) 74<br>Epissomal (4) 12  | $0,09 \pm 2,54$<br>$11,82 \pm 182,67$<br>$0,12 \pm 3.770,41$ | $0,117^1$  |
| não (3)                           | Integrado (1) 33<br>Misto (2) 67                       | $4,23^*$<br>$298,32 \pm 596,43$                              | *          |
| Fumo<br>sim (8)                   | Integrado (3) 38<br>Misto (4) 50<br>Epissomal (1) 12   | $0,11 \pm 182,83$<br>$1.456,55^*$<br>$0,11^*$                | *          |
| não (30)                          | Integrado (3) 10<br>Misto (24) 80<br>Epissomal (3) 10  | $4,23^*$<br>$7,78 \pm 89,22$<br>$0,14^*$                     | $0,893^1$  |

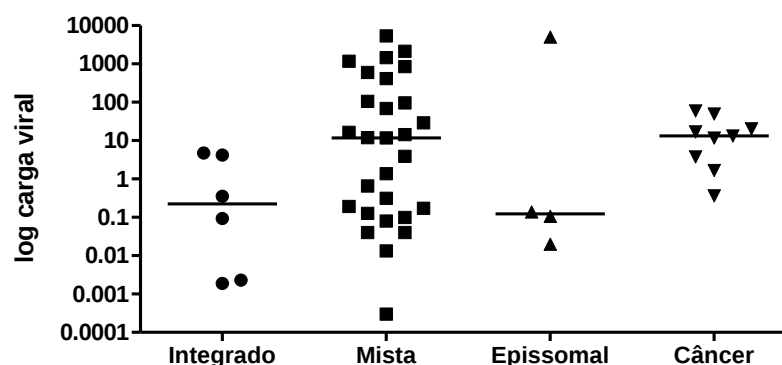
<sup>1</sup> Teste Kruskal Wallis

\* Impossível o cálculo devido ao tamanho da amostra.

Dos 38 casos de HPV-16 encontrados, 16% (06/38) estavam sob a forma integrada, 10% (4/16) na forma epissomal e 73% (28/38) na forma mista (82% (23/28) na variação de 20-80 (% epissomal-% integração, respectivamente), 7% (2/28) na variação 40-60, 4% (1/28) na variação 60-40 e 7% (2/28) na variação 80-20). Dentre os 38 pacientes com HPV-16, 84% (32/38) apresentavam condiloma acuminado e destes, 13% (4/32) apresentavam DNA-HPV-16 na forma integrada (Tabela 7).

A mediana da carga viral detectada nas três formas de estado físico do DNA-HPV-16 foi de 0,22 cópias/célula para a forma integrada, 11,82 cópias/célula para a forma mista e 0,12 cópias/célula para a forma epissomal. Os valores individuais de carga viral do HPV-16 categorizados quanto ao estado físico do DNA-HPV-16 e os valores das amostras de câncer peniano onde todas encontram-se integradas estão representados na Figura 15.

**Figura 15**



Valores logarítmicos de carga viral das amostras penianas categorizadas quanto ao estado físico do DNA-HPV-16 como integradas, mistas e epissomais e das amostras de câncer peniano onde o HPV-16 encontra-se integrado em todas elas. As linhas horizontais indicam os valores de mediana das amostras analisadas.

As amostras epissomais foram também testadas quanto ao estado físico com o par de iniciadores que identificam quebras na região aminoterminal da proteína E2. Mesmo empregando esse par de oligonucleotídeos, a forma integrada não foi detectada nessas amostras.

Diferença significativa foi encontrada na comparação dos diferentes estados físicos do HPV-16 nas amostras penianas de pacientes com condiloma acuminado ( $p=0,041$ ).

Análises estatísticas realizadas comparando as cargas virais das amostras de câncer com as não câncer, independente do padrão de integração, foram realizadas e não foram encontradas diferenças significativas ( $p = 0,141$ ) (Tabela 9). Diferenças significativas também não foram detectadas quando a carga viral das amostras câncer foi comparada àquelas apresentadas pelas amostras não câncer, categorizadas de acordo com o estado físico do DNA como misto ( $p = 0,821$ ) ou epissomal ( $p = 0,165$ ). No entanto, houve diferença significativa ao se comparar carga viral das amostras de carcinoma com a carga viral das amostras não câncer apresentando estado físico integrado ( $p = 0,012$ ).

**Tabela 9** – Carga viral das amostras neoplásicas e não neoplásicas, categorizadas de acordo com o estado físico do DNA-HPV-16

| Amostras (n)    | Mediana da Carga viral $\pm$ intervalo interquartil (cópias/célula) | Valor de p           |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Câncer (9)      | 13,29 $\pm$ 32,50 <sup>a1, a2, a3, a4</sup>                         |                      |
| Não câncer (38) | 2,64 $\pm$ 98,40 <sup>a1</sup>                                      | 0,141 <sup>1*</sup>  |
| Epissomal (4)   | 0,12 $\pm$ 3.770,41 <sup>a2</sup>                                   | 0,165 <sup>2**</sup> |
| Mista (28)      | 11,82 $\pm$ 338,38 <sup>a3</sup>                                    | 0,821 <sup>3**</sup> |
| Integrada (6)   | 0,22 $\pm$ 4,35 <sup>b4</sup>                                       | 0,012 <sup>4**</sup> |

Teste de Kruskal Wallis\* e Mann-Whitney\*\*.

Números iguais indicam o mesmo teste; Letras diferentes indicam diferença estatística.

Não foram encontradas diferenças significativas ao se comparar a carga viral dos diferentes estados físicos em pacientes assintomáticos e com condiloma, integradas (carga viral das amostras de estado físico integrado vs estado físico misto,  $p=0,066$ ; carga viral das amostras de estado físico integrado vs estado físico epissomal,  $p=0,762$ ; carga viral das amostras de estado físico misto vs estado físico epissomal,  $p=0,457$ ).

#### 4.9 Carga viral, estado físico e recidiva de condiloma

Dados sobre a recidiva de condiloma acuminado e o tratamento realizado para esta lesão foram coletados dos prontuários de 77 pacientes. A taxa de recidiva de condiloma nestes pacientes foi de 43% (33/77). Algumas lesões mostraram-se resistentes ao tratamento com podofilina (39%, 30/77), sendo necessária a utilização

de tratamentos alternativos como a aplicação de ácido tricloroacético (ATA) e/ou eletrocauterização. Dos pacientes resistentes ao tratamento com podofilina, 63% (19/30) apresentaram recidivas e, destes recidivantes, 58% (11/19) apresentavam múltiplas infecções. Nos pacientes cujo tratamento com podofilina mostrou-se eficaz na regressão da lesão (47), a recidiva foi de 30% (14/47), sendo que a maioria destes (10/14, 71%) apresentava múltiplas infecções. Entre aqueles que apresentaram recidivas, 57% (19/33) foram resistentes ao tratamento com podofilina.

A carga viral do HPV-16 para o grupo de pacientes que apresentou recidiva foi menor do que naqueles sem recidiva da lesão (Tabela 10). As lesões resistentes ao tratamento com podofilina mostraram menor carga viral de HPV-16 que aquelas não resistentes (Tabela 11). No entanto, nessas correlações não foi encontrada diferença significativa entre os grupos. Os valores individuais de carga viral do HPV-16 para os pacientes de condiloma recidivantes (A) e resistentes ao tratamento com podofilina (B) estão demonstrados na Figura 16.

Os dados relativos ao estado físico do DNA-HPV-16 dos grupos de pacientes com condiloma acuminado recidivante e não recidivante, resistentes ou não ao tratamento com podofilina encontram-se descritos na Tabela 10 e 11. Observa-se que o número de amostras com DNA integrado nas amostras de pacientes que apresentaram recidiva, resistentes ou não a podofilina foi semelhante àquele detectado os pacientes sem recidiva.

**Tabela 10 – Recidiva de condiloma acuminado, carga viral e estado físico DNA-HPV-16**

| Recidivas<br>(n) | Mediana da Carga Viral<br>± intervalo interquartil<br>(cópias/ célula) | Valor de p* | Estado físico do HPV-16<br>(n) %                      |
|------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------------------------------------------------|
| Sim (16)         | 0,18 ± 55,28                                                           | 0,4397      | Integrado (5) 45<br>Misto (5) 45<br>Epissomal (1) 10  |
| Não (16)         | 7,78 ± 660,95                                                          |             | Integrado (10) 50<br>Misto (7) 35<br>Epissomal (3) 15 |

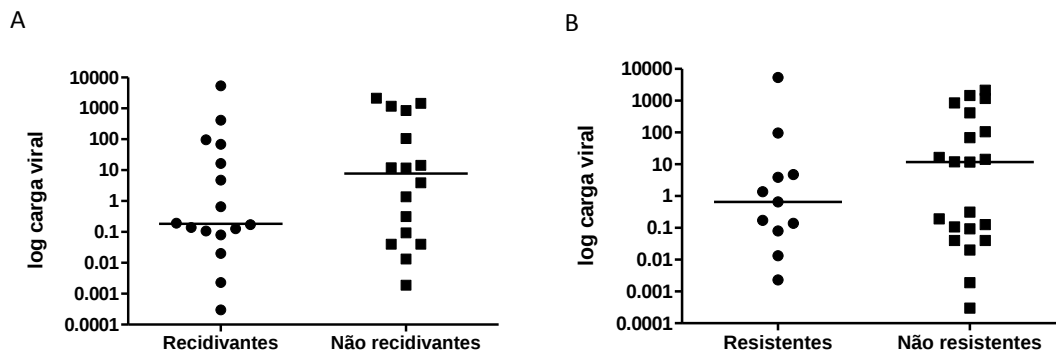
\*Mann Whitney

**Tabela 11** – Resistência ao tratamento com podofilina de condiloma acuminado, carga viral e estado físico do DNA-HPV-16

| Resistência ao tratamento com podofilina (n) | Mediana da Carga Viral $\pm$ intervalo interquartil (cópias/ célula) | Valor de $p^*$ | Estado físico do HPV-16 (n) %                         |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------|
| Sim (11)                                     | 0,65 $\pm$ 4,65                                                      | 0,579          | Integrado (2) 18<br>Misto (8) 73<br>Epissomal (1) 9   |
| Não (21)                                     | 11,67 $\pm$ 260,63                                                   |                | Integrado (2) 10<br>Misto (17) 80<br>Epissomal (2) 10 |

\*Mann Whitney

**Figura 16**



Valores logarítmicos de carga viral do HPV-16 dos pacientes com condiloma acuminado recidivantes e não recidivantes (A) e dos resistentes ou não ao tratamento com podofilina (B). As linhas horizontais indicam os valores de mediana das amostras analisadas.

#### 4.10 Evolução da carga viral e estado físico do DNA-HPV-16

Os resultados das coletas seqüenciais estão descritos na Tabela 11. Dos 38 pacientes infectados por HPV-16, apenas 15 (39%) retornaram para uma segunda coleta.

Dos 15 pacientes que retornaram até o momento, 3 são homens assintomáticos e 12 pacientes com condiloma. Dos pacientes assintomáticos, 2 pacientes apresentaram sua carga viral aumentada, mesmo após o tratamento de sua parceira (Tabela 11). Quanto aos pacientes portadores de condiloma, 58% (7/12)

*apresentaram redução da carga viral do HPV 16, após o tratamento da lesão. Destes 7 pacientes, 71% (5/7) apresentou boa resposta à podofilina, apenas 29% (2/7) mostraram recidiva da lesão e 5 mantiveram o estado físico do HPV-16 encontrado anteriormente. Os 5 pacientes restantes apresentaram aumento da carga viral, 4 deles mostraram recidiva do condiloma e 3 aumentaram a incidência de integração (Misto 40-60 para integrado, Misto 80-20 para integrado, Misto 80-20 para Misto 20-80) (Tabela 12).*

**Tabela 12 – Informações sobre o retorno dos pacientes para as coletas sucessivas.**

| Pacientes | Data e tipo viral         |                       | Carga viral*/ estado físico** |                      | Tipo de paciente e tratamento                                                            |
|-----------|---------------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
|           | 1ª coleta                 | 2ª coleta             | 1ª coleta                     | 2ª coleta            |                                                                                          |
| 1         | 17/08/10<br>16            | 30/03/11<br>16 e 6/11 | 4,23<br>Integrado             | 6.175<br>Misto 20-80 | Assintomático<br>Mulher CAF                                                              |
| 2         | 09/11/10<br>16 e 6/11     | 20/06/11<br>16 e 6/11 | 0,35<br>Integrado             | 0,21<br>Misto 20-80  | Assintomático<br>Mulher CAF                                                              |
| 3         | 05/07/11<br>16            | 06/03/12<br>16        | 0,1<br>Misto 20-80            | 2,1<br>Integrado     | Assintomático<br>Mulher CAF                                                              |
| 4         | 17/11/10<br>16 e 6/11     | 31/01/11<br>16 e 6/11 | 4,73<br>Integrado             | 0,11<br>Misto 40-60  | Condiloma<br>Resistente à podofilina, encaminhado para cauterização<br>1 recidiva        |
| 5         | 24/11/10<br>16, 18 e 6/11 | 12/04/11<br>16 e 6/11 | 68<br>Integrado               | 59<br>Integrado      | Condiloma<br>Podofilina<br>1 recidiva                                                    |
| 6         | 05/04/11<br>16 e 6/11     | 21/10/11<br>16 e 6/11 | 5.386<br>Misto 20-80          | 0,28<br>Misto 20-80  | Condiloma<br>Resistente à podofilina, encaminhado para tratamento com ATA<br>2 recidivas |
| 7         | 05/04/11<br>16, 18 e 6/11 | 18/10/11<br>16 e 18   | 12<br>Integrado               | 0,006<br>Integrado   | Condiloma<br>Podofilina<br>Sem recidiva                                                  |
| 8         | 06/04/11<br>16 e 6/11     | 21/10/11<br>16 e 6/11 | 14<br>Integrado               | 0,11<br>Integrado    | Condiloma<br>Podofilina<br>Sem recidiva                                                  |
| 9         | 07/04/11<br>16 e 6/11     | 07/06/11<br>16 e 6/11 | 105<br>Integrado              | 0,002<br>Integrado   | Condiloma<br>Podofilina<br>Sem recidiva                                                  |

**Tabela 12 - Continuação – Informações sobre o retorno dos pacientes para as coletas sucessivas.**

| Pacientes | Data e tipo viral     |                       | Carga viral*/ estado físico** |                      | Grupo do paciente e tratamento                    |
|-----------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------|
|           | 1ª coleta             | 2ª coleta             | 1ª coleta                     | 2ª coleta            |                                                   |
| 10        | 24/05/11<br>16 e 6/11 | 12/08/11<br>16 e 6/11 | 16<br>Misto 20-80             | 2.206<br>Misto 40-60 | Condiloma<br>Podofilina<br>2 recidivas/ gonorreia |
| 11        | 02/06/11<br>16 e 6/11 | 10/08/11<br>16 e 6/11 | 0,19<br>Misto 40-60           | 1,02<br>Integrado    | Condiloma<br>Podofilina<br>3 recidivas            |
| 12        | 07/06/11<br>16 e 6/11 | 18/10/11<br>16 e 6/11 | 0,09<br>Integrado             | 0,33<br>Integrado    | Condiloma<br>Podofilina<br>Sem recidiva           |
| 13        | 08/11/11<br>16 e 6/11 | 28/02/12<br>16        | 1,4<br>Misto 80-20            | 65<br>Integrado      | Condiloma<br>Podofilina/ ATA<br>1 recidiva        |
| 14        | 11/11/11<br>16 e 6/11 | 29/02/12<br>16 e 33   | 846<br>Misto 20-80            | 80<br>Integrado      | Condiloma<br>Podofilina<br>Sem recidiva / HIV +   |
| 15        | 16/02/12<br>16, 6/11  | 19/09/12<br>16        | 0,65<br>Misto 80-20           | 2.443<br>Misto 20-80 | Condiloma<br>Podofilina/ATA<br>1 recidiva         |

\* cópias/ célula

\*\* 20-80 = 20% epissomal (pHPV16) e 80% integrado (pE6), 40-60 = 40% epissomal (pHPV16) e 60% integrado (pE6)

## 5 DISCUSSÃO

*Alta prevalência de infecção por HPV foi encontrada neste trabalho (87%). Esse dado está de acordo com a literatura. HPV pode ser detectado, em seu maior índice, em aproximadamente 93% dos homens em risco de infecção por este vírus (SMITH et al., 2011). Além disso, o Brasil tem sido relatado como um país com elevada prevalência de infecção por HPV, quando comparado com outros países (FRANCESCHI et al., 2002; GUILIANO et al., 2011; HPV STUDY GROUP IN MEN FROM BRAZIL, USA AND MEXICO, 2008).*

*Entre os 77 pacientes com condiloma acuminado que participaram deste estudo, em apenas dois (3%) não foi detectado o HPV-6/11, embora tenham apresentado DNA-HPV, cujo tipo não foi pesquisado neste trabalho. É grande a variação dos índices de prevalência de HPV de baixo e alto risco encontrada na literatura, de acordo com a população estudada. Em trabalhos de revisão (PARTRIDGE & KOUTSKY, 2006; SMITH et al., 2011), a prevalência de HPV de baixo risco encontrada em homens variou de 1 a 84%, sendo que em 70 a 100% dos casos de condiloma acuminado são detectados HPVs dos tipos 6 e 11, assim como observado no presente trabalho. De forma semelhante, o índice de prevalência de HPV de alto risco detectado (54%) está dentro da faixa relatada por outros autores com variação de 2 a 93% (PARTRIDGE & KOUTSKY, 2006; SMITH et al., 2011), sendo mais prevalente o HPV tipo 16.*

*A prevalência de HPV-16 detectada foi de 38%, sendo que 42% dos pacientes com condiloma acuminado possuíam co-infecção com este vírus. Dentre os pacientes assintomáticos positivos para infecção por HPV, a prevalência do HPV-16 detectada foi elevada (60% - 6/10). Este fato pode estar associado à maior persistência da infecção, uma vez que ela é tipo-específica, sendo o HPV-16 um dos mais persistentes (RAMANAKUMAR et al., 2010).*

*Os altos índices de HPV de alto risco em homens, detectados nesse trabalho, demonstram a necessidade de medidas educativas direcionadas para essa população e reforçam a importância da vacinação dos homens, por estes favorecerem a manutenção da transmissão destes vírus causadores do câncer cervical e peniano. Estima-se que o risco de câncer de colo de útero é 4,9 vezes maior em mulheres parceiras de homens infectados por HPV (BOSCH et al., 1996) e que a existência de condiloma acuminado aumentaria as chances*

de carcinoma peniano em 3,7 vezes (POW-SANG et al., 2010). Além disso, verrugas genitais podem ser consideradas como um problema público de saúde, gerando grande custo ao estado e ao próprio indivíduo, com redução em sua qualidade de vida (DEDIOL et al., 2009; GIULIANO et al., 2008; WOODHALL et al., 2009).

Os 13 pacientes negativos para infecção por HPV eram homens assintomáticos, parceiros de mulheres com lesão de alto grau e com tempo médio de relacionamento de 12 anos, tempo que é superior ao que é relatado para o clearance da infecção por HPV verificada em homens. Existem evidências que o tempo médio de infecção por HPV em homens seja de 7,5 meses e, em caso de infecção pelo HPV-16, este prazo se estenda para 12,2 meses. Além disso, infecções persistentes são menos comuns em homens (GIULIANO et al., 2011; PARTRIDGE & KOUTSKY, 2006) e sua chance de clearance mais alta (49% vs 31%) (GIULIANO et al., 2011).

Outro fator que poderia contribuir para explicar a ausência de HPV em homens cujas parceiras são portadoras de lesão de alto grau seria a reduzida carga viral esperada nestas parceiras. Sabe-se que a frequência de integração do HPV é maior em lesões mais graves. Uma vez integrado o genoma viral, a replicação viral fica limitada à multiplicação celular, estabelecendo um ciclo produtivo incompleto, em que partículas virais não chegam a ser formadas (ARIAS-PULIDO et al., 2006; DOOBAR et al., 2012). Como consequência, haveria menor carga viral, dificultando a transmissão e potencialmente, caso esta ocorresse, possibilitando uma resposta mais eficaz do sistema imunológico.

Múltiplas infecções causadas por diferentes tipos de HPV foram encontradas em 48% dos pacientes. Em nosso outro estudo, múltiplas infecções foram prevalentes em 39,5% dos homens analisados, sendo que 34,8% apresentavam associação de HPV de alto e baixo risco (de LIMA-ROCHA et al. 2012). Estes índices estão de acordo com aqueles relatados na literatura, onde nota-se uma variação de 2,3 a 60% para co-infecção (PARTRIDGE & KOUTSKY, 2006; VACCARELLA et al., 2011). Co-infecções são achados frequentes em populações de risco, existindo vários relatos de infecções múltiplas com a presença de HPVs de alto risco em lesões condilomatosas (ANIC et al., 2011; BALDWIN et al., 2003; BALL et al., 2011;

HO et al., 1998; KATELARIS et al., 1988; LÖWHAGEN et al., 1993; SKERLEV et al., 2002). Trabalhos recentes, conduzidos tanto em homens (VACCARELLA et al., 2011) como em mulheres (CHATUVERDI et al., 2011), demonstram que co-infecções ocorrem ao acaso e que há pouca evidência de aumento de susceptibilidade ou exclusão competitiva/proteção cruzada com qualquer HPV tipo específico. Aspectos como comportamento sexual e a resposta imunológica podem influenciar na prevalência de múltiplas infecções (CHATUVERDI et al., 2011). Outros trabalhos relatam a existência de proteção cruzada entre HPVs filogeneticamente próximos (FU XI et al., 2009, WHEELER et al., 2009). Portanto, ainda há controvérsias na literatura sob essa questão de aumento de susceptibilidade ou exclusão competitiva/proteção cruzada na literatura.

Presença de infecções múltiplas requer atenção, uma vez que a presença de múltiplos tipos virais foi associada significativamente ao desenvolvimento de lesões neoplásicas na região anal em homens e, portanto, podem atuar sinergicamente para o desenvolvimento de câncer (risco aditivo) (ALVAREZ et al., 2010). Kadaja et al. (2007) observaram experimentalmente que a expressão, mesmo que transitória de E1 e E2, concomitante à infecção por HPV16 e 18 podem levar à instabilidade genômica. Assim, múltiplas infecções por HPVs de baixo risco, na forma epissomal, mantém a expressão de E1 e E2, levariam à instabilidade genômica, desencadeada pela amplificação de cópias do genoma integrado e sua reintegração de novo no genoma da célula hospedeira levando, potencialmente, à perda e ganho de funções e aumento da expressão dos oncogenes virais E6/E7, pelo aumento do número de cópias do genoma do HPV16 ou 18 integradas, como discutido por esses autores.

No presente trabalho, múltiplas infecções estavam presentes em 63% dos casos de recidiva, embora diferenças significativas não tenham sido observadas. Assim, esse achado pode, portanto, ser fortuito, e influenciado por fatores individuais não investigados, como resposta imune, infecção por outros patógenos e reinfecção, assim como mecanismos moleculares que poderiam também determinar a maior predisposição à recidiva na presença de co-infecção.

Existem poucos trabalhos na literatura que quantificaram a carga viral do HPV em homens e estes trabalhos variam quanto ao tipo de amostra

analisada. Foram detectadas cargas virais em homens apresentando diferentes lesões, tais como condiloma acuminado (ANIC et al., 2011; BALL et al., 2011; de MARCO et al., 2001), lesões intraepiteliais anais (ALVAREZ et al., 2010; KREUTER et al., 2007; PIERANGELI et al., 2008, POIZOT-MARTIN et al., 2009; SALIT et al., 2009), lesões planas penianas (BLEEKER et al., 2005b; BLEEKER et al., 2006) e câncer peniano (DO et al., 2012; KALANTARI et al., 2008; POW-SANG et al., 2010; TORNESELLO et al., 1997). Há variação também entre os estudos quanto ao método de quantificação utilizado. Ora vírus de alto risco são quantificados, ora vírus de baixo risco, além das diferentes formas de expressar os valores de carga viral (cópias/célula; cópias/ $10^6$  células, cópias/ $10^5$  células,  $\log_{10}$  cópias/ $10^5$  células; cópias/esfregaço; cópias/ng de DNA total; cópias/cópias de  $\beta$ -globina). Todas estas variações dificultaram as comparações dos dados gerados neste trabalho com aqueles relatados na literatura.

A grande variabilidade entre as cargas virais encontradas neste trabalho, para um mesmo perfil de amostra, também é relatado por outros autores (ALVAREZ et al., 2010; BALL et al., 2011; DO et al., 2012; HEIDEMAN et al., 2007; KREUTER et al., 2007; PIERANGELI et al., 2008; SALIT et al., 2009). Verificam-se, nesses estudos, elevados valores de erro padrão (desvio padrão ou intervalos interquartis). Como consequência dessa elevada variabilidade, grande número de amostras é necessário para permitir análises estatísticas significativas. Cálculo amostral foi realizado para as amostras do presente estudo, que indicou serem necessárias 100 mil a 1 milhão de amostras, dependendo da relação a ser analisada. De fato, nossos dados evidenciam elevados erros padrão, dificultando a análise estatística dos dados, especialmente em relação aos dados referentes à carga viral. Pela dificuldade em se alcançar estes valores para o tamanho de amostra, este trabalho deve ser considerado, portanto, apenas como descritivo, sendo essa uma limitação do mesmo. Ressalta-se que apesar de pequeno, o número de amostras não difere dos trabalhos conduzidos com homens, existentes na literatura (BALL et al., 2011; de MARCO et al., 2001; KALANTARI et al., 2008; KREUTER et al., 2007; PIERANGELI et al., 2008; POIZOT-MARTIN et al., 2009; TORNESELLO et al., 1997).

*Em relação à integração, neste trabalho, as duas regiões mais prováveis para a quebra do gene E2, que são a porção aminoterminal e a região de dobradiça, foram analisadas para a determinação mais precisa do estado físico do DNA-HPV-16. Dentre os 100 pacientes estudados neste trabalho, detectou-se a forma integrada do estado físico do DNA-HPV-16 em 16% das amostras, a forma mista em 74% e epissomal em 10 % das amostras. Constata-se elevada prevalência de integração do DNA, ou seja, 90% dos pacientes, considerando que na forma mista ocorre algum grau de integração.*

*Integração ocorreu na presença tanto de cargas virais elevadas como em reduzidas e parece não modificar diante da ocorrência de múltiplas infecções e da presença ou não de condiloma acuminado. Foram encontradas diferenças significativas apenas em dois dos aspectos analisados: 1) na variação de carga viral das amostras de condiloma, ao se comparar os diferentes estados físicos ( $p=0,041$ ) e 2) ao se comparar a carga viral das amostras neoplásicas (13,29 cópias/célula) e não neoplásicas que apresentaram DNA integrado (0,22 cópias/célula).*

*Com relação à variação de carga viral das amostras de condiloma, observa-se uma carga viral epissomal menor que a carga viral encontrada para a forma mista. Esta observação pode ser explicada pelo pequeno número amostral para a forma epissomal ou por um efeito temporal. Neste trabalho não foi determinado o momento exato da infecção e não houve avaliação da variação da carga viral com o passar do tempo. Verificou-se também uma redução da carga viral após a estabilização da forma integrada com a instauração do ciclo produtivo incompleto. Outra possível explicação estaria associada à instabilidade genômica decorrente da maior expressão de E1 e E2, pelas formas epissomais, levando à amplificação do número de cópias integradas e, conseqüentemente, aumento de E6 e E7 pelas formas integradas, como descrito por Kadaja et al. (2007).*

*A diferença estatística ( $p = 0,012$ ) de carga viral encontrada para a comparação entre a carga viral das amostras neoplásicas (13,29 cópias/célula) em comparação com as não neoplásicas que apresentaram DNA integrado (0,22 cópias/célula), poderia também ser explicada pelo mecanismo de instabilidade genômica, como descrito acima, baseado nas evidências descritas por Kadaja et al. (2007), relacionada ao aumento da expressão*

concomitantemente de E1 e E2, pelos epissomos e de E6 e E7 pelas cópias do genoma integradas.

São poucos os trabalhos que avaliaram a prevalência do estado físico do DNA-HPV-16 em amostras masculinas (ALVAREZ et al., 2010; DO et al., 2012; KALANTARI et al., 2008, TORNESELLO et al., 1997). Alvarez et al. (2010) detectaram, em amostras de anais de pacientes HIV positivos, que 94,3% do DNA-HPV-16 estavam na forma epissomal, 3,3% na forma mista e 1,4% na forma integrada. No entanto, outros autores verificaram em amostras de câncer peniano a integração do DNA-HPV-16 em 89% (DO et al., 2012), 80% (TORNESELLO et al., 1997) e, em 73%, quando a integração estava associada ou não a forma epissomal (KALANTARI et al., 2008).

Os índices de integração do DNA detectados no presente trabalho assemelham-se, em parte, aos encontrados em outros estudos de câncer peniano, apesar de aplicação de metodologias distintas (KALANTARI et al., 2008; TORNESELLO et al., 1997). Ao pesquisarmos o estado físico do DNA nas nove amostras de câncer peniano, utilizando a mesma metodologia que a usada nas amostras coletadas dos 100 pacientes, constatou-se que todos os casos de câncer peniano apresentavam integração do DNA-HPV.

Sabe-se que a incidência de lesões pré-cancerosas ou cancerosas em homens é menor que em mulheres, apesar da infecção por HPV-16 ocorrer em alta prevalência em ambos os sexos (TOTA et al., 2011; TROTTIER et al., 2010). Estudos mostram que alterações morfológicas indicativas da infecção por HPV em amostras penianas são também raras (de LIMA ROCHA et al., 2008; BOON et al., 1988). Em nosso estudo anterior (DE LIMA ROCHA et al., 2008), raras alterações citológicas foram observadas por meio da técnica de citologia em meio líquido, em um grupo de pacientes com características similares aos analisados no presente trabalho, sendo todos oriundos do CTDST. Nosso dados corroboram os resultados de outros autores, sugerindo que o processo de integração é importante, mas por si só, parece insuficiente para o desenvolvimento destas lesões (KALANTARI et al., 2008; POW-SANG et al., 2010; TORNESELLO et al., 1997). Alvarez et al. (2010) relatam ser o processo de integração algo frequente e ocorrendo tanto em células normais, quanto em células neoplásicas.

Vários fatores poderiam interferir na evolução das lesões na região peniana. Dentre eles, destacam-se a menor prevalência de infecções persistentes, as maiores chances de clearance da infecção, devido a uma maior descamação das células epiteliais e as menores cargas virais (GUILIANO et al., 2011; MARKS et al., 2011). A ausência da junção escamo-colunar pode ser outro fator importante para a menor frequência de desenvolvimento de câncer peniano. Na junção escamo-colunar, o HPV pode infectar as células metaplásicas que possuem alto potencial de multiplicação e um microambiente próprio (HERFS et al., 2012; MCNAIRN & GUASCH, 2011), o que pode promover um aumento na carga viral e, conseqüente, progressão de lesões. Dados de prevalência de associação da infecção por HPV e câncer anal podem reforçar essa hipótese, já que essa região também possui a junção escamo-colunar (KALANTARI et al., 2008; POW-SANG et al., 2010). O câncer anal também é considerado um evento raro, sendo que 40% ocorrem em homens e 60% em mulheres (GIULIANO et al., 2008), mas sua associação com a infecção por HPV é alta, variando de 71% a 93% (ZANDBERG et al., 2012). O HPV16 é o mais comum, estando presente em 80% dos casos (GIMENEZ et al., 2008). Outros fatores, como o local de integração ao genoma, possibilitando a ativação de oncogenes ou desativação de genes supressores de tumor, e os processos de metilação do DNA viral desencadeados pela integração são também fenômenos significativos no processo carcinogênico do HPV e que em conjunto com o microambiente do epitélio peniano poderiam determinar a menor incidência de neoplasia associada ao HPV, nessa região (DALL et al., 2008; KALANTARI et al., 2008; LI et al., 2013; MOTOVINA et al., 2009, SCHMITZ et al., 2012).

A taxa de recidiva de lesões observada neste trabalho foi de 43%. Alguns condilomas (39%) mostraram-se resistentes ao tratamento com podofilina, sendo necessária a utilização de outros tratamentos, como a aplicação de ácido tricloroacético (ATA) e/ou eletrocauterização. Outros trabalhos mostram ser a resistência ao tratamento e as recidivas algo frequente, sendo o tempo médio de recorrência dos condilomas, após tratamento com podofilina, de 6-12 meses (BUCK, 2007; HSUEH, 2009).

Com base nos dados gerados neste trabalho, verifica-se que a recidiva de condilomas não parece estar associada a cargas virais elevadas ( $p=0,4397$ ). No entanto, analisando-se a evolução da carga viral, 4 de 5 pacientes que tiveram um aumento de carga viral do HPV-16 da primeira para a segunda coleta, apresentaram recidiva. Ressalva feita ao pequeno número amostral. Recidiva foi mais frequente em pacientes com múltiplas infecções (63%).

De forma similar, a resistência do condiloma acuminado ao tratamento com podofilina parece não estar associado à alta carga viral, podendo ser provocado por características específicas do próprio indivíduo relacionadas, à idade, ao sistema imune (atopia), e/ ou do condiloma acuminado, tais como pigmentação e tamanho da lesão (BEUTNER et al., 1998, SELLORS & LAW, 1994, STEFANAKI et al., 2010).

Lacey (2005), em seu trabalho de revisão, questiona a necessidade de tratamento de verrugas já que este demanda tempo e custos elevados, gera ansiedade e desconforto nos pacientes, sem a certeza de cura, além das verrugas genitais serem proliferações benignas que costumam causar sintomas leves. O contrário, uma das justificativas para tratamento, estaria relacionada aos altos índices de infecção com HPVs de alto risco nessas lesões e a associação das mesmas com o câncer (ANIC et al., 2011; BALDWIN et al., 2003; BALL et al., 2011; HO et al., 1998; KADAJA et al., 2007; KATELARIS et al., 1988; LÖWHAGEN et al., 1993; SKERLEV et al., 2002), além dos transtornos psicológicos e nos relacionamentos conjugais (DEDIOL et al., 2009; GIULIANO et al., 2008; WOODHALL et al., 2009).

Em síntese, os resultados observados mostram que carga viral é um fator altamente variável e, talvez, não se constitua em um marcador significativo do processo de infecção por HPV, em amostras penianas. Em contraste, a alta prevalência de HPV-16 detectada nos pacientes com condiloma e naqueles com múltiplas infecções e a frequente integração do genoma viral, inclusive sob forma mista, observada nessas amostras, sugerem que estes pacientes merecem acompanhamento devido ao potencial que estas condições podem representar para a progressão de lesões neoplásicas. Estas considerações finais encontram suporte na frequente detecção de alterações displásicas observadas em análises histopatológicas de amostras de condiloma peniano (BAYDAR et al., 2013).

*Assim, este estudo acrescenta informações à uma literatura escassa, contribuindo para um melhor entendimento da relação entre carga viral e do processo de integração na infecção por HPV em homens e reforça a necessidade de mais estudos sobre o processo infeccioso do HPV nesta população.*

## 6 CONCLUSÕES

*- Homens atendidos no Centro de Referência em DSTs da prefeitura de Belo Horizonte, MG, com condiloma acuminado ou parceiros assintomáticos de mulheres com lesão intraepitelial de alto grau, apresentam elevada prevalência de infecção por HPV, em especial do HPV-16 e de co-infecções com outros tipos virais;*

*- Homens com condiloma acuminado ou assintomáticos infectados pelo HPV-16 apresentam ampla variação de carga viral, independente do estado físico do genoma deste vírus, seja ele integrado ou episossomal.*

*- A maioria dos homens infectados pelo HPV-16 apresenta o genoma deste vírus no estado físico integrado, assim como as amostras de carcinoma peniano estudadas, sugerindo que a integração pode constituir um fator importante para a carcinogênese do câncer peniano, mas não único.*

*- A integração do genoma do HPV-16 parece não ser influenciada pela presença de condiloma acuminado ou de múltiplas infecções.*

*- A integração do genoma do HPV-16 parece ocorrer tanto em baixas cargas virais quanto em elevadas, seja em homens com condiloma acuminado ou assintomáticos.*

*- Apesar do pequeno número de pacientes estudados que retornaram para avaliação, existe tendência de redução na carga viral com o tratamento de condiloma acuminado.*

*- Carga viral elevada não se correlacionou com a maior frequência de recidivas e com resistência ao tratamento com podofilina.*

*- Maior frequência de recidiva foi encontrada em amostras infectadas por mais de um tipo viral.*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAN, C. A.; et al.. HPV-16 and BPV-1 infection can be blocked by the dynamin inhibitor dynasore. *Am J Ther*, v. 15, p. 304-311, 2008.

AKOGBE, G. O.; et al.. Race and prevalence of human papillomavirus infection among men residing in Brazil, Mexico and the United States. *International Journal of Cancer*, v. 131, p. E282–E291, 2012.

ALBERO G.; et al.. Male circumcision and genital human papillomavirus: a systematic review and meta-analysis. *Sexually Trans Diseases*, v. 39, p. 104-113, 2012.

ALVAREZ, J.; et al.. Episomal and integrated human papillomavirus type 16 loads and anal intraepithelial neoplasia in HIV-seropositive men. *AIDS*, v. 24, p. 2355–2363, 2010.

ANDERSON, J. S.; et al.. A randomized, placebo-controlled, dose-escalation study to determine the safety, tolerability, and immunogenicity of HPV-16 therapeutic vaccine in HIV-positive participants with oncogenic HPV infection of the anus. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 52, p. 371-381, 2009.

ANIC, G. M.& GIULIANO, A. R.. Genital HPV infection and related lesions in men. *Preventive Medicine*, v. 53, p. S36–S41, 2011.

ANIC, G. M.; et al.. Incidence and Human Papillomavirus (HPV) Type Distribution of Genital Warts in a Multinational Cohort of Men: The HPV in Men Study. *Journal of Infectious Diseases*, v. 204, p. 1886-1892, 2011.

ANIC, G. M.; et al.. Risk factors for Incident condiloma in a multinational cohort of men: the HIM study. *J Infec Diseases*, v. 205, p. 789-793, 2012.

ARIAS-PULIDO, H.; et al.. Human Papillomavirus Type 16 Integration in Cervical Carcinoma In Situ and in Invasive Cervical Cancer. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 5, p. 1755–1762, 2006.

AYALA, G. E.; et al.. Human Papillomavirus - Related Lesions of the Penis. *Pathology Case Reviews*, v. 10, n. 1, p. 14-20, 2005.

AYNAUD, O.; et al.. Penile intraepithelial neoplasia. Specific clinical features correlate with histologic and virologic findings. *Cancer*, v. 15, n. 74 (6), p. 1762-1767, 1994.

BALDWIN, S. B.; et al.. Human papillomavirus infection in men attending a sexually transmitted disease clinic. *Journal Infectious Diseases*, v. 187, p. 1064-1070, 2003.

BALL, S. L. R.; et al.. Analyses of Human Papillomavirus Genotypes and Viral Loads in Anogenital Warts. *Journal of Medical Virology*, v. 83, p. 1345–1350, 2011.

BAYDAR, D. E.; et al.. Occurrence of dysplasia and human papillomavirus typing in penile condylomas. *Urology*, v. 81, p. 211.e9- 211.e15, 2013.

BERNARD, H.; et al.. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, v. 401, p. 70–79, 2010.

BEUTNER, K. R.; et al.. External genital warts: report of the American Medical Association Consensus Conference. *Clinical Infectious Diseases*, v. 27, n. 4, p. 796-806, 1998.

BLEEKER, M. C. G.; et al.. Flat penile lesions: The infectious “invisible” link in the transmission of human papillomavirus *International Journal of Cancer*, v. 119, p. 2505–2512, 2006.

BLEEKER, M. C. G.; et al.. HPV type concordance in sexual couples determines the effect of condoms on regression of flat penile lesions. *British Journal of Cancer*, v.92, p. 1388-1392, 2005a.

BLEEKER, M. C. G.; et al.. Concordance of Specific Human Papillomavirus Types in Sex Partners Is More Prevalent than Would Be Expected by Chance and Is Associated with Increased Viral Loads. *Clinical Infectious Diseases*, v. 41, p. 612-620, 2005b.

BOON, M.E.; et al.. Penile studies and heterosexual partners. *Peniscopy, cytology, histology, and Immunocytochemistry. Cancer*, v. 61, n. 8, p. 1652-1659, 1988.

BOSCH, F. X.; et al.. Male Sexual Behavior and Human Papillomavirus DNA: Key Risk Factors for Cervical Cancer in Spain. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 88, n.15, P. 1060-1067, 1996.

BRADY, K. I., et al.. Malignant tumors of the penis. *Dermatol Surg*, v. 39, p. 527-547, 2012.

BROCCOLO, F.; et al.. Comparison of oncogenic HPV type-specific viral DNA load and E6/E7 mRNA detection in cervical samples: results from a multicenter study. *J Med Virol*, v. 85, p. 472-482, 2012.

BRYAN, J. T. & BROWN, D. R.. Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology*, v. 281, n. 1, p. 35-42, 2001.

BUCK, H. W. JR. Genital warts. *Clinical Evidence*, v. 8, p. 1602-1617, 2007.

CAI, Q.; et al. Human papillomavirus early proteins and apoptosis. *Arch Gynecol Obstet*, v.287, p. 541-548, 2012.

CARCOPINO, X.; et al.. Evaluation of Type-Specific HPV Persistence and High-Risk HPV Viral Load Quantitation in HPV Positive Women Under 30 With Normal Cervical Cytology. *Journal of Medical Virology*, v. 83, p. 637–643, 2011.

CHATURVEDI, A. K.; et al.. *Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. Journal Infectious Disease*, v. 203, p. 910-920, 2011.

CHAUX, A.; et al.. *Distribution and characterization of subtypes of penile intraepithelial neoplasia and their association with invasive carcinomas: a pathological study of 139 lesions in 121 patients. Human Pathology*, v. 43, p. 1020-1027, 2012.

CHE, Y.M.; et al.. *Correlation between deoxyribonucleic acid loads of human papillomavirus and recurrence of condylomata acuminata. International Journal of STD and AIDS*, v. 16, n. 9, p. 605-607, 2005.

CHELIMO, C.; et al.. *Risk factors for and prevention of human papillomavirus (HPV), genital warts and cervical cancer. J Infect*, v. 66, p. 207-217, 2013.

CHEUNG, J. L. K.; et al.. *Viral Load, E2 Gene Disruption Status, and Lineage of Human Papillomavirus Type 16 Infection in Cervical Neoplasia. Journal Infectious Disease*, v. 194, p. 1706-1712, 2006.

CHOW, L. T.; et al.. *The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v. 118, p. 422-449, 2010.

CHUNG, S.; et al.. *Requirement for stromal estrogen receptor alpha in cervical neoplasia. Horm Canc*, v. 4, p. 50-59, 2013.

CRICCA M.; et al.. *Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. Gynecologic Oncology*, v.106, p.549-557, 2007.

CROW, J. M.; et al.. *The global burden. Nature*, v. 488, p. S2-S3, 2012.

CUBILLA, A. L.; et al.. *Epithelial lesions associated with invasive penile squamous cell carcinoma: a pathologic study of 288 cases. Int J Surg Pathol*, v. 12, p. 351-364, 2004.

DALING, J. R.; et al.. *Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. International Journal of Cancer*, v. 116, n. 4, p. 606-616, 2005.

DALL, K. L.; et al.. *Characterization of naturally occurring HPV16 integration sites isolated from cervical keratinocytes under noncompetitive conditions. Cancer Res*, v.68, p. 8249-8259, 2008.

DE MARCO, F.; et al.. *Detection of HPV in genital condylomata: correlation between viral load and clinical outcome. Journal Experimental and Clinical Cancer Research*, v. 20, n. 3, p. 377-383, 2001.

DE LIMA ROCHA, M. G.; et al.. *Detection of Human Papillomavirus Infection in Penile Samples Through Liquid-based Cytology and Polymerase Chain Reaction. Cancer (Cancer Cytopathology)*, v. 114, n. 6, p. 489-493, 2008.

DE LIMA ROCHA, M. G.; et al.. *Prevalence of DNA-HPV in Male Sexual Partners of HPV-Infected Women and Concordance of Viral Types in Infected Couples. PLoS One*, v. 7, n. 7, 2012.

DE RODA HUSMAN, A. M.; et al.. *The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. Journal of Genetic Virology*, v. 76, p. 1057-1062, 1995.

DE VILLIERS, E. M.. *Relation ship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. International Journal of Cancer*, v. 103, p. 705-708, 2003.

DE VILLIERS, E-M.; et al.. *Classification of papillomaviruses. Virology*, v. 324, p. 17-27, 2004.

DEDIOL, I., et al.. *Psychological burden of anogenital warts. Journal European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 23, p. 1035 –1038, 2009.

DO, H. T. T.; et al.. *The etiologic role of human papillomavirus in penile cancers: a study in Vietnam. British J Cancer*, v. 108, p. 229-233, 2013.

DOOBAR, J.; et al.. *The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vaccine*, v. 30S, p. F55-F70, 2012.

DOORBAR, J.. *The papillomavirus life cycle. Journal of Clinical Virology*, v. 32S, p. S7–S15, 2005.

DUNNE, E. F.; et al.. *Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature. Journal of Infectious Diseases*, v. 194, n. 8, p. 1044-57, 2006.

DURHAM, D. P.; et al.. *Reevaluation of epidemiological data demonstrates that it is consistent with cross-immunity among human papillomavirus types. J Infect Dis.*, v. 206, p. 1291-1298, 2012.

FAVORITO, L.A.; et al.. *Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. International Brazilian Journal of Urology*, v. 34, n. 5, p. 587-591, 2008.

FERENCZY, A.. *Epidemiology and clinical pathophysiology of condylomata acuminata. American Journal Obstetrics & Gynecology*, v.172, n.4, p.1331-1339, 1995.

FORMAN, D.; et al.. *Global burden of human papillomavirus and related diseases. Vaccine*, v. 30S, p. F12-F23, 2012.

FRANCESCHI, S.; et al.. *Prevalence and determinants of human papillomavirus genital infection in men. Britsh Journal of Cancer*, v. 86, p. 705-711, 2002.

FREGA, A.; et al.. Oral contraceptives and clinical recurrence of human papillomavirus lesions and cervical intraepithelial neoplasia following treatment. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, v. 100, n.2, p. 175-178, 2008.

FU XI, L. ; et al.. Viral Load in the Natural History of Human Papillomavirus Type 16 Infection: A Nested Case–Control Study. *Journal Infectious Diseases*, v. 203, p.1425-1433, 2011.

FU XI, L.; et al.. Human papillomavirus types 16 and 18 DNA load in relation to coexistence of other types, particularly those in the same species. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, v. 18, p. 2507-2512, 2009.

GIMENEZ, F. S.; et al.. Prevalência de Lesões Precursoras do Câncer Anal em Indivíduos HIV Positivos, Atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Experiência Inicial em Manaus. *Revista brasileira de Coloproctologia*, v. 28, n. 1m p. 72-76, 2008.

GIULIANO, A. R.; et al.. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet*. v. 377, p. 932–940, 2011.

GIULIANO, A. R.; et al.. Epidemiology of Human Papillomavirus Infection in Men, Cancers other than Cervical and Benign Conditions. *Vaccine*, v. 26, p. K17–K28, 2008.

GIULIANO, A. R.; et al.. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study. *Journal Infectious Diseases*, v. 196, n. 8, p. 1146-1152, 2007.

GRABOWSKA, A. K. & RIEMER, A. B.. The invisible enemy – how human papillomaviruses avoid recognition and clearance by the host immune system. *Open Virol J*, v. 6, p. 249-256, 2012.

GRAVITT, P. E.; et al.. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *International Journal of Cancer*, v. 121, p. 2787–2793, 2007.

GRAVITT, P. E.; et al.. Reproducibility of HPV-16 and HPV-18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods*, v. 112, p. 23-33, 2003.

GRCE, M.; et al.. Detection and typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction in cervical scrapes of Croatian women with abnormal cytology. *European Journal of Epidemiology*, v. 13, p. 645-651, 1997.

HEIDEMAN, D. A. M.; et al.. Human Papillomavirus-16 Is the Predominant Type Etiologically Involved in Penile Squamous Cell Carcinoma. *Journal of clinical oncology*, v. 25, n. 29, p. 4550-4556, 2007.

HERFS, M.; et al.. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 109, n. 26, p. 10516-10521, 2012.

HO, G. Y.; et al.. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New England Journal Medicine*, v. 338, p. 423-428, 1998.

HOWIE, H. L.; et al.. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, v. 384, p. 324-334, 2009.

HPV STUDY GROUP IN MEN FROM BRAZIL, USA AND MEXICO. Human papillomavirus infection in men residing in Brazil, Mexico, and the USA.. *Salud Publica de Mexico*, v. 50, n. 5, p. 408-418, 2008.

HSUEH, P.. Human papillomavirus, genital warts, and vaccines. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 42, p. 101-106, 2009.

HUANG, L. W.; et al.. Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues. *Journal of Clinical Virology*, v. 29, n. 4, p. 271-276, 2004.

HUGHES, G. C. & CLARK, E. A.. Regulation of dendritic cells by female sex steroids: relevance to immunity and autoimmunity. *Autoimmunity*, v. 40, n. 6, p. 470-481, 2007.

HWANG, L. Y.; et al.. Active squamous metaplasia of the cervical epithelium is associated with subsequent acquisition of human papillomavirus 16 infection among healthy young women. *J Infectious Diseases*, v. 206, p. 504-511, 2012.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativas para o ano de 2012. [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br).

KADAJA, M.; et al.. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathogens*, v. 5, p. 1-16, e1000397, 2009.

KADAJA, M.; et al.. Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *Embo J*, v. 26, p. 2180-2191, 2007.

KALANTARI, M.; et al.. Human papillomavirus-16 and -18 in penile carcinomas: DNA methylation, chromosomal recombination and genomic variation. *Internacional Journal Of Cancer*, v. 123, p. 1832–1840, 2008.

KATELARIS, P.; et al.. Human papillomavirus: the untreated male reservoir. *Journal Urology*, v. 140, n. 300-305, 1988.

KIM, J. W.; et al.. Factors affecting the clearance of high risk Human Papillomavirus infection and the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Int Med Res*, v. 40, p. 486-496, 2012.

KREUTER, A.; et al.. p16ink4a expression decreases during imiquimod treatment of anal intraepithelial neoplasia in human immunodeficiency virus-infected men and correlates with the decline of lesional high-risk human papillomavirus DNA load. *British Journal of Dermatology*, v. 157, p. 523–530, 2007.

KRUSTRUP, D.; et al.. Histological characteristics of human papilloma-virus-positive and -negative invasive and in situ squamous cell tumours of the penis. *Int J Exp Path*, v. 90, p. 182-189, 2009.

LACEY, C. J. N.; et al.. 2012 European guideline for the management of anogenital warts. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, v. 27, p. e263-e270, 2013.

LACEY, C. J. N.. Therapy for genital human papillomavirus-related disease. *Journal of Clinical Virology*, v. 32, p. S82–S90, 2005.

LANIOSZ, V.; et al.. Human papillomavirus type 16 infection of human keratinocytes requires clathrin and caveolin-1 and is brefeldin A sensitive. *J Virol*, v. 83, p. 8221–8232, 2009.

LETO, M. G. P.; et al.. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 2, p. 306-317, 2011.

LEYVA, A. & KELLEY, W. N.. Measurement of DNA in cultured human cells. *Analytical Biochemistry*, v. 62, p. 173–179, 1974.

LI, H.; et al.. Preferential sites for the integration and disruption of human papillomavirus 16 in cervical lesions. *J Clin Virol*, v. 56, p. 342-347, 2013.

LO, K. W.; et al.. Quantitative analysis of human papillomavirus type 16 in cervical neoplasm: a study in Chinese population. *Journal of Clinical Virology*, v. 34, n. 1, p. 76-80, 2005.

LOWE, B.; et al.. Distribution of Human papillomavirus load in clinical specimens. *Journal of Virological Methods*, v. 173, p. 150–152, 2011.

LÖRINCZ, A. T.; et al.. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *The Lancet*, v. 360, p. 228-229, 2002.

LÖWHAGEN, G-B.; et al.. The prevalence of high-risk HPV types in penile condiloma-like lesions: correlation between HPV type and morphology. *Genitourinary medicine*, v. 69, n. 2, p. 87-90, 1993.

MÄNNIK, A.; et al.. Induction of the bovine papillomavirus origin “onion skin” – type DNA replication at high E1 protein concentrations in vivo. *J Virol*, v. 76, p. 5835-5845, 2002.

MANZIONE, C. R.; NADAL, S. R.; CALORE, E. E.. Oncogenicidade Do Papilomavírus Humano e o Grau De Neoplasia Intra-Epitelial Anal em Doentes HIV Positivo. *Revista Associação Médica Brasileira*, v. 50, n. 3, p. 282-285, 2004.

MARKS, M.; et al.. Kinetics of DNA load predict HPV 16 viral clearance. *Journal of Clinical Virology*, v. 51, p. 44–49, 2011.

MATOVINA, M.; et al.. Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol Oncol*, v. 113, p. 120-127, 2009.

MATSUMOTO, Y.; et al.. Involvement of a cellular ubiquitin-protein ligase E6AP in the ubiquitin-mediated degradation of extensive substrates of high-risk human papillomavirus E6. *J Med Virol*, v. 78, p. 501-507, 2006.

McLAUGHLIN-DRUBIN, M. E. & MÜNGER, K.. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res*, v. 143, p. 195-208, 2009.

McNAIRN, A.J. & GUASCH, G.. Epithelial transition zones: merging microenvironments, niches, and cellular transformation. *European Journal of Dermatology*, v. 21, n. 2, p. 21-28, 2011.

MOBERG, M.; GUSTAVSSON, I.; GYLLENSTEN, U.. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *International Journal of Cancer*, v. 112, n. 5, p. 854-859, 2004.

MOSCICKI, A. B.; et al.. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine*, v. 30S, p. F24-F33, 2012.

MONNIER-BENOIT, S.; et al.. Dynamics of HPV 16 load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. *Journal of Clinical Virology*, v. 35, n.3, p. 270-277, 2006.

NGUYEN, C. L. & MÜNGER, K.. Human papillomavirus E7 protein deregulates mitosis via an association with nuclear mitotic apparatus protein 1. *J Virol*, v. 83, p. 1700-1707, 2009.

NICOLAU, S. M.; et al.. Human papillomavirus DNA detection in male sexual partners of women with genital human papillomavirus infection. *Urology*, v. 65, n. 2, p. 251-255, 2005.

ORIEL, J.D.. Natural history of genital warts - 1971. *Sexually Transmitted Infections*, v. 76, n. 1, p. S21-23, 2000.

OLSEN, J. & JEPSEN, M. R.. Human papillomavirus transmission and cost-effectiveness of introducing quadrivalent HPV vaccination in Denmark. *Int J Technol Assess Health Care*, v. 26, p. 183-191, 2010.

PARKIN, D. N.; et al.. Burden and trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the latin america and Caribbean region. *Vaccine*, v. 26, L1-L15, 2008.

PARTRIDGE, J. M. & KOUTSKY, L. A.. Genital human papillomavirus infection in men. *The Lancet*, v. 6, p. 21-31, 2006.

PEITSARO, P.; et al. *Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found in Cervical Cancer Precursors as Demonstrated by a Novel Quantitative Real-Time PCR Technique. Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 3, p. 886–891, 2002.

PIERANGELI A.; et al.. *Type-specific human papillomavirus-DNA load in anal infection in HIV-positive men. AIDS*, v. 22, n. 15, p. 1929–1935, 2008.

POIZOT-MARTIN, I.; et al.. *High level of HPV 16 and 18 DNA load in anal swabs from male and female HIV-1 infected patients. Journal of Clinical Virology*, v. 44, p. 314–317, 2009.

POW-SANG, M. R.; et al.. *Epidemiology and Natural History of Penile Cancer. Urology*, v. 76, n. 2A, p. S2-S6, 2010.

RAMANAKUMAR, A. V.; et al.. *Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. BMC Infectious Diseases*, v. 10, p. 326-337, 2010

REEP, K. K.; et al.. *Male human papillomavirus prevalence and association with condom use in Brazil, Mexico, and USA. J Infectious Diseases*, v. 205, p. 1287-1293, 2012.

RENAUD-VILMER, C.; et al.. *Analysis of alterations adjacent to invasive squamous cell carcinoma of the penis and their relationship with associated carcinoma. J Acad Dermatol*, v.62, p. 284-290, 2010.

ROMBALDI, R. L.; et al.. *Infection with human papillomaviruses of sexual partners of women having cervical intraepithelial neoplasia. Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 39, p. 177-187, 2006.

ROSENBLATT, C.; et al.. *HPV prevalence among partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. International Journal Gynecology & Obstetrics*, v. 84, p. 156-161, 2004.

RUBIN, M. A.; et al.. *Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: Evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. American Journal Pathology*, v. 159, p. 1211-1218, 2001.

SAIKI, R.K.; et al.. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science*, v. 239, p. 487-491, 1988.

SALIT, I. E.; T et al.. *Screening for HIV-Associated Anal Cancer: Correlation of HPV Genotypes, p16, and E6 Transcripts with Anal Pathology. Cancer Epidemiology, Biomarkers Prevention*, v. 18, n.7, p. 1986-1992, 2009.

SANCLEMENTE, G.; et al.. *Human papillomavirus (HPV) viral load and HPV type in the clinical outcome of HIV-positive patients treated with imiquimod for anogenital warts and anal intraepithelial neoplasia. Journal European Academy of Dermatology and Venereology*, v.21, p. 1054–1060, 2007.

SCHEINER, M. A.; et al.. *Human Papillomavirus and Penile Cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV Typing and Clinical Features. International Brazilian Journal Urology*, v. 34, n. 4, p. 467-476, 2008.

SCHELHAAS, M.; et al.. *Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. Plos Pathogens*, v. 8, p. 1-21, e1002657, 2012.

SCHIFFMAN, M. & CASTLE, P.E.. *Human papillomavirus epidemiology and public health. Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, v. 127, p. 930-934, 2003.

SCHMITZ, M.; et al.. *Loss of gene function as a consequence of human papillomavirus DNA integration. Int J Cancer*, v.131, p. E593-E602, 2012.

SELLORS, J. W. & LAW, C.. *Anogenital human papillomavirus infection Changes in understanding and management. Canadian Family Physicians*, v. 40, p. 93-101, 1994.

SMITH, J. S.; et al.. *Age-Specific Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Males: A Global Review. Journal of Adolescent Health*, v. 48, p. 540–552, 2011.

SKERLEV, M.; et al... *Human Papillomavirus Male Genital Infections: Clinical Variations and the Significance of DNA Typing. Clinics in Dermatology*, v. 20, n. 173–178, 2002.

STEFANAKI, C.; et al.. *Atopic patients with genital warts have a more protracted clinical course and a greater probability of recurrences. International Journal STD & AIDS*, v. 21, n. 10, p.723-727, 2010.

SYRJANEN, K.. *Dynamics of genital human papillomavirus (HPV) infections among males eventually being uncovered Asian. Journal of Andrology*, v. 13, p. 361–362, 2011.

TORNESELLO, M. L.; et al.. *Sequence variations and viral genomic state of human papillomavirus type 16 in penile carcinomas from Ugandan patients. Journal of General Virology*, v. 78, p. 2199–2208, 1997.

TOTA, J. E.; et al.. *Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: Implications for prevention strategies. Preventive Medicine*, v. 53, p. S12–S21, 2011.

TROTTIER, H.; et al.. *Human papillomavirus infection and reinfection in adult women: the role of sexual activity and natural immunity. American Association for Cancer Research*, v. 70, n. 21, p. 8569-8577, 2010.

VACCARELLA, S.; et al.. *Clustering of Human Papillomavirus (HPV) Types in the Male Genital Tract: The HPV in Men (HIM) Study. Journal Infectious Diseases*, v. 204, p. 1500-1504, 2011.

VAN DUIN, M.; et al.. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *International Journal of Cancer*, v. 98, p. 590-595, 2002.

VIDELA, S.; et al.. Natural history of Human papillomavirus infections involving anal, penile, and oral sites among HIV-positive men. *Sex Trans Diseases*, v. 40, p. 3-10, 2013.

WANG-JOHANNING, F.; et al.. Quantitation of human papillomavirus 16 e6 and e7 dna and rna in residual material from thinprep papanicolaou tests using real-time polymerase chain reaction analysis. *Cancer*, v. 94, n. 8, p. 2199-2210, 2002.

WECHSLER, E. I.; et al.. Reconstruction of human papillomavirus type 16-mediated early-stage neoplasia implicates E6/E7 deregulation and the loss of contact inhibition in neoplastic progression. *Virology*, v. 86, p. 6358-6364, 2012.

WHEELER, C. M.; et al.. The impact of quadrivalent Human papillomavirus (HPV; Types 6, 11, 16, and 18) L1 Virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in sexually active women aged 16–26 years. *J Infect Diseases*, v. 199, p. 936-944, 2009.

WHELAN, J. A.; et al.. A method for the absolute quantification of Cdna using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, v. 278, p. 261– 269, 2003.

WIELAND, U.; et al.. Communication papillomavirus DNA in basal cell carcinomas of immunocompetent patients: an accidental association? *J Invest Dermatol*, v. 115, p. 124-128, 2000.

WILEY, D. J.; et al.. External Genital Warts: Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Clinical Infectious Diseases*, v. 35, n. 2, p. S210-224, 2002.

WILSON, L. E.; et al.. Male circumcision reduces penile high-risk human papilloma virus viral load in a randomised clinical trial in Rakai, Uganda. *Sex Transm Infect*, v. 89, p. 262-266, 2012.

WINER, R.L.; et al.. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *New England Journal of Medicine*, v. 354, n. 25, p. 2645-2654, 2006.

WOODHALL, S. C.; et al.. Cost of Treatment and QALYs Lost Due to Genital Warts: Data for the Economic Evaluation of HPV Vaccines in the United Kingdom. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 36, n. 8, p. 515-521, 2009.

YOSHIDA T.; et al.. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the type distribution, viral load, and physical status of human papillomavirus in liquid-based cytology samples from cervical lesions. *International Journal of Gynecological Cancer*, v.18, p.121-127, 2008.

YUAN, C. H.; et al.. Modulation of apoptotic pathways by human papillomavirus (HPV) mechanisms and implications for therapy. *Viruses*, v. 4, p. 3831-3850, 2012.

ZANDBERG, D. P.; et al. *The role of human papillomavirus in nongenital cancers. Cancer J Clin*, v. 63, p. 57-81, 2012.

ZUR HAUSEN, H.. *Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. Virology*, v. 384, n. 2, p. 260-265, 2009.

## ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

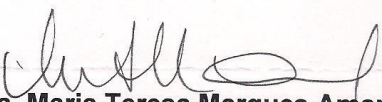
Parecer nº. ETIC 0088.0.410.203-09

**Interessado(a):** Profa. Paula Ávila Fernandes  
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Faculdade de Farmácia - UFMG

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 13 de julho de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Análise da carga viral e do estado físico do DNA-HPV 16 em amostras penianas por meio da técnica de PCR em tempo real"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
Coordenadora do COEP-UFMG

**ANEXO 2**

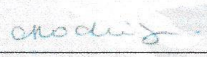
**Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte**  
**Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos**

**Parecer: 0088.0.410.203-09A**

**Pesquisadora responsável:** Paula Ávila Fernandes - Faculdade de Farmácia da UFMG – Tese de Doutorado, com orientação da Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes desta mesma Faculdade.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte – CEP/SMSA/BH aprovou em 07 de abril de 2010, o projeto de pesquisa intitulado “**Análise da carga viral e do estado físico do DNA-HPV 16 em amostras penianas por meio da técnica de PCR em tempo real**”, bem como seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao CEP um ano após início do projeto ou ao final deste, se em prazo inferior a um ano.



**Celeste de Souza Rodrigues**

Coordenadora do CEP/SMSA/BH

## APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### **Análise da carga viral e do estado físico do DNA-HPV 16 em amostras penianas por meio da técnica de PCR em tempo real**

*Prezado Senhor,*

*O senhor está sendo convidado a participar de um estudo que será desenvolvido na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais que tem por finalidade estudar as lesões penianas causadas pela infecção pelo Papilomavírus Humano.*

*Este vírus, o HPV, é transmitido sexualmente e pode causar diferentes alterações, desde lesões benignas até o câncer de pênis. Existem diferentes tipos de HPV. Lesões mais sérias são, na grande maioria das vezes, causadas por HPV classificados como de alto risco. Por outro lado, as verrugas genitais são geralmente causadas por HPV classificados como de baixo risco.*

*Esta pesquisa é importante porque o HPV associa-se com o câncer anal e peniano. Além disso, o homem pode transmitir este vírus para as suas parceiras, levando ao desenvolvimento de câncer do colo do útero nas mulheres.*

*Para sua participação no estudo serão colhidas amostras contendo células da pele peniana. O exame não apresenta risco algum à saúde. Serão utilizados somente materiais descartáveis e de boa qualidade. A coleta das células será realizada utilizando-se uma escovinha, a qual será usada em algumas regiões do pênis para coletar o material. Todas as células removidas serão encaminhadas ao laboratório para a realização dos testes. A coleta das células pode causar um pequeno desconforto. Raramente ocorrem irritações na pele e/ou sangramento. Para evitar estes transtornos será evitada a coleta em áreas sensíveis.*

*Serão realizadas coletas a cada seis meses para avaliar a evolução da quantidade de vírus presente e para correlacionar estes resultados com a permanência ou recidiva das alterações no pênis. Não haverá nenhum prejuízo*

*para a sua pessoa e para seu acompanhamento na unidade de saúde, caso o senhor desista de participar da pesquisa a qualquer momento.*

*As suas respostas ao questionário e o material coletado serão usados somente para esta pesquisa, e os resultados serão mantidos em sigilo. Seu nome e sua participação na pesquisa não serão divulgados.*

*Os exames serão gratuitos e não haverá compensação financeira na sua participação nesta pesquisa. Serão realizados testes para a detecção do HPV e identificação do(s) tipo(s) viral(s). A liberação do resultado será feita no prazo de dois meses e a comunicação da entrega do laudo informada por telefone.*

*Sua participação é voluntária. Você tem o direito de se recusar a participar a qualquer momento sem qualquer prejuízo para o seu tratamento e/ou de sua parceira.*

*Caso você tenha alguma dúvida sobre o estudo, poderá contactar as pesquisadoras deste estudo, Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes e/ou Dra. Paula Ávila Fernandes, pelos telefones 3409-6884 ou 3409-6879, na Faculdade de Farmácia da UFMG, localizada na Av. Antônio Carlos, 6627, bloco 3, 4º andar, salas 4090 e 4116 ou o comitê de ética em pesquisa – COEP, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, telefone 3409-4592, também localizado na Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha. Poderá ainda contactar o Comitê de ética em pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde, localizado na Av. Afonso Pena, 2336, 9º andar, telefone 3277-8222.*

*Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim descrevendo o estudo: “Análise da carga viral e do estado físico do DNA-HPV 16 em amostras penianas por meio da técnica de PCR em tempo real”.*

---

*Assinatura da paciente/representante legal*

---

*Assinatura da testemunha*

*Data*

**APÊNDICE 2 – QUESTIONÁRIO DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS****Nome:****Número de registro:****Data:****Idade:****Telefone:***Paciente: Sem lesão ( )**Com lesão( ) Localização do condiloma: \_\_\_\_\_**Data da primeira coleta: \_\_\_\_\_**Tratado: Sim ( )**Como? \_\_\_\_\_**Não ( )**Recidivas (data/ tratamento realizado):*

|       |       |
|-------|-------|
| _____ | _____ |
| —     |       |
| _____ | _____ |
| —     |       |
| _____ | _____ |
| —     |       |
| _____ | _____ |
| —     |       |

*Data das demais coletas: \_\_\_\_\_ Sinais: \_\_\_\_\_**\_\_\_\_\_ Sinais: \_\_\_\_\_**\_\_\_\_\_ Sinais: \_\_\_\_\_**\_\_\_\_\_ Sinais: \_\_\_\_\_*

*ESTABILIDADE CONJUGAL*

*Tempo de relacionamento:* \_\_\_\_\_

*Possui parceiras extra-conjugais? Não ( )*

*Sim ( )*

*Quantas?* \_\_\_\_\_

*Usa camisinha? Sim ( )*

*Não ( )*

*Uso de camisinha com a parceira:*

*nunca ( )*

*às vezes ( ) Por quê?* \_\_\_\_\_

*sempre ( )*

*Condiloma ou evidencia de infecção por HPV previamente?*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

*Sexo anal: Sim ( ) Não ( )*

*Fumante: Sim ( ) Não ( )*

*Circuncisão: Sim ( ) Não ( )*

**APÊNDICE 3 – QUESTIONÁRIO DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS -  
RETORNO**

**Nome:**

**Número de registro:**

**Data:**

**Telefone:**

*Paciente: Sem lesão ( )*

*Com lesão( ) Localização do condiloma: \_\_\_\_\_*

*Relacionamento continua estável? Sim ( )*

*Não ( )*

*Alguma mudança em seu comportamento sexual com a parceira?*

---

---

---

---

---

---

---

---

*Dados da parceira:*

*Prontuário: \_\_\_\_\_*

*Foi submetida a algum tratamento após a data da coleta anterior?*

---

---

---