

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

ALICE CAPOBIANGO

**FREQÜÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO ANAL
EM MULHERES SEM IMUNODEFICIÊNCIA E
COM NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL**

Belo Horizonte
2008

ALICE CAPOBIANGO

**FREQÜÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO ANAL
EM MULHERES SEM IMUNODEFICIÊNCIA E
COM NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina.

Área de concentração: Anatomofisiopatogenia cirúrgica.

Linha de pesquisa: Bases moleculares das neoplasias - farmacogenética e farmacogenômica.

Orientador: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes.

Co-orientador: Prof. Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho.

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina da UFMG

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR:

Prof. Dr. Ronaldo Tadêu Pena

PRÓ-REITOR:

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Dr. Francisco José Penna

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Dr. Carlos Faria Santos Amaral

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

Prof. Dr. Edson Samesina Tatsuo (coordenador)

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches (subcoordenador)

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Aurélio Lanna Peixoto

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Denny Fabrício Magalhães (representante discente)

Aos meus pais, Ione e Alúzio,
que com amor me conduziram até aqui,
a gratidão pela minha vida.

Aos meus irmãos, Áurea, Fátima e Alúzio,
pela amizade e companheirismo no caminho.

Aos meus sobrinhos, Rafael, Thiago, Aline, Paula, Diego e Pedro,
pela alegria.

A Deus, por dar sentido à vida.

Ao meu amigo Tarcizo, pelo exemplo e constante apoio.

AGRADECIMENTOS

Aos que, de alguma forma, colaboraram para que este trabalho tivesse êxito.

Particularmente:

À Profa. Mestra Edna Maria L. de Castro, pela importante ajuda na avaliação das pacientes, meu carinho especial.

Aos ginecologistas e residentes de ginecologia do Hospital Mário Pena e aos residentes de ginecologia do HC-UFMG, pela contribuição para a realização do presente estudo.

À pesquisadora Nara Oliveira Carvalho.

Ao Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico – NUPAD.

E a todos aqueles que, involuntariamente, omitimos.

“Senhor,
Fazei de mim um instrumento de vossa Paz!
Onde houver Ódio, que eu leve o Amor,
Onde houver Ofensa, que eu leve o Perdão.
Onde houver Discórdia, que eu leve a União.
Onde houver Dúvida, que eu leve a Fé.
Onde houver Erro, que eu leve a Verdade.
Onde houver Desespero, que eu leve a Esperança.
Onde houver Tristeza, que eu leve a Alegria.
Onde houver Trevas, que eu leve a Luz!
Ó Mestre,
fazei que eu procure mais:
consolar, que ser consolado;
compreender, que ser compreendido;
amar, que ser amado.
Pois é dando que se recebe.
É perdoando que se é perdoado e
é morrendo que se vive para a vida eterna!”

São Francisco de Assis

RESUMO

A infecção anal pelo papilomavírus humano (HPV) tem aumentado consideravelmente, concomitante ao aumento do número de casos de câncer nesta região. No câncer de colo uterino, a associação entre infecção por HPV e neoplasias já foi comprovada, sugerindo o efeito oncogênico desses vírus. Os objetivos deste estudo foram avaliar a frequência de HPV anal em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), verificar a concordância entre os subtipos encontrados quando presentes nos dois locais e investigar os fatores que influenciaram a ocorrência de HPV anal em mulheres com NIC sem evidências clínicas de imunodepressão. Foram estudadas 52 mulheres com idade entre 16 e 72 anos e diagnóstico de neoplasia intra-epitelial cervical graus I, II e III. A identificação do DNA (ácido desoxirriboucléico) do HPV e de sete subtipos dos vírus foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em material colhido em ânus e colo uterino. Foram pesquisados, a partir de questionário, os fatores que poderiam contribuir para a infecção anal, tais como paridade, número de parceiros, tabagismo, manipulação e coito anal e o tipo de doença ginecológica. Das 52 mulheres, foi diagnosticado HPV na região anal em 25 (48%), das quais 23 (44%) também apresentavam HPV no colo uterino, sendo este resultado significativo. Em 16 (31%) houve diagnóstico de HPV somente no colo uterino e em 11 (21%) não foi identificado o vírus em colo ou ânus. Concluiu-se que: as mulheres com HPV genital têm mais probabilidade de serem acometidas por HPV anal; não há concordância unânime entre os subtipos do HPV do colo do útero e do ânus e a paridade e o número de parceiros contribuem para aumentar a incidência de HPV anal nas mulheres sem imunodeficiência e com HPV cervical.

Palavras-chave: Papilomavírus humano (HPV). Doenças do ânus/virologia. Colo uterino. Reação em cadeia da polimerase (PCR).

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) infection at the anal region has considerably increased, concomitantly increasing the number of cancer cases in this region. This association had already been proven with the cervical cancer which suggests the virus oncogenic effect. This study aims were to assess the frequency of HPV anal infection in patients with cervical intra-epithelial neoplasia (CIN), to find out the relation between the found subtypes when present in both regions and investigate factors that influenced the occurrence of anal HPV in women with CIN. Fifty two women with age between 16 and 72 years and cervical intra-epithelial neoplasia (CIN) diagnosis, grades I,II and III were studied. Material from anus and uterine cervix were obtained to identify the virus deoxyribonucleic acid (DNA) and seven virus subtypes through polymerase chain reaction (PCR). Factors that could contribute to anal infection like number of children, number of sexual partners, smoking practice, anal manipulation and intercourse, and grade of gynecologic disease were investigate by questionnaire. From the fifty two women, anal HPV diagnoses happened in 25 (48%), and 23 (44%) of them had HPV in uterine cervix as well. In 16 (31%) the HPV diagnosis occurred only in uterine cervix and in 11 (21%) no HPV was detected in anus and uterine cervix. In conclusion, women with cervical intra-epithelial neoplasia have more probability to be infected with anal HPV; there is no unanimous concordance among HPV sub-types in uterine cervix and anus and the number of children and sexual partners contribute to increase the anal infection incidence in women without immuno-deficiency, with cervical HPV infection.

Key-Words: Human papillomavirus (HPV). Anus. Uterine cervix. Polymerase chain reaction (PCR).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCE	Carcinoma de células escamosas
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
HIV	<i>Human immunodeficiency acquired</i>
HPV	Papilomavírus humano
LI	Limite inferior de confiança
LS	Limite superior de confiança
NIA	Neoplasia intra-epitelial anal
NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
NIPA	Neoplasia intra-epitelial perianal
NIV	Neoplasia intra-epitelial vulvar
NIVA	Neoplasia intra-epitelial vaginal
NUPAD	Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RPM	Rotação por minuto
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organizaton</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Pesquisa do HPV na região anal e colo uterino em mulheres com NIC (n=52).....	32
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características gerais, categoria e número de casos.....	25
TABELA 2 - Presença do HPV e seus subtipos e a frequência encontrada na região anal e colo uterino em mulheres com NIC.....	33
TABELA 3 - Co-ocorrência dos subtipos de HPV na região anal e colo uterino em mulheres com NIC.....	34
TABELA 4 - Associação entre subtipos do HPV em mulheres com NIC.....	35
TABELA 5 – Variáveis estudadas na infecção por HPV na região anal em mulheres com NIC.....	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 Papilomavírus humano.....	17
3.1.1 Diagnóstico.....	18
3.1.2 Classificação das lesões causadas pelo HPV.....	19
3.1.3 Tratamento.....	19
3.1.4 Prevenção.....	20
3.2 Associação entre papilomavírus humano e câncer.....	20
4 CASUÍSTICA E MÉTODO.....	23
4.1 Casuística.....	23
4.1.1 Avaliação clínica e exames laboratoriais.....	23
4.1.2 Critérios de inclusão.....	23
4.1.3 Critérios de exclusão.....	24
4.1.4 Casuística e características gerais da amostra.....	24
4.2 Métodos.....	25
4.2.1 Exames ginecológico e proctológico.....	25
4.2.1.1 Exame ginecológico.....	26
4.2.1.2 Exame proctológico.....	26
4.2.2 Técnica da tipagem do HPV pelo PCR.....	27
4.2.2.1 Extração do DNA.....	27
4.2.2.2 Tipagem do HPV por PCR alelo-específico.....	28
4.2.2.3 Condições da reação de PCR.....	28
4.2.2.4 Programa para amplificação no termociclador.....	29
4.2.2.5 Condições da eletroforese.....	29
4.2.3 Técnica do exame anatomopatológico.....	30
4.2.4 Variáveis estudadas e testes estatísticos.....	30

5 RESULTADOS.....	32
5.1 Presença de HPV anal em mulheres com infecção genital por este vírus.....	32
5.2 Frequência e subtipos de HPV anal em mulheres com NIC e sem evidências de doença anal.....	33
5.3 Fatores que influenciaram a ocorrência de HPV anal em mulheres com NIC...	35
6 DISCUSSÃO.....	37
7 CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICES E ANEXO.....	49

1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) foi a doença sexualmente transmissível mais diagnosticada no Brasil no período de 1998 a 2001, tanto em homens (39,6%) como em mulheres (21%) e sua incidência tem aumentado nos últimos anos. Acomete pessoas de qualquer idade, embora seja mais comum em jovens, provavelmente devido à maior atividade sexual nesse período. Sua associação com o vírus da imunodeficiência adquirida pode atingir 62% dos casos (NADAL *et al.*, 2004).

A associação entre infecção por HPV de alto risco e neoplasia de ânus em homens e mulheres com imunodeficiência ou imunossupressão está confirmada (MANZIONE; NADAL; CALORE, 2004; NADAL *et al.*, 2004; SOBHANI *et al.*, 2001). Nesses pacientes, as medidas relacionadas à vigilância já estão padronizadas. Em pacientes sem imunodeficiências, entretanto, essa associação ainda não está esclarecida, o que pode contribuir para a falta de normas adequadas para diagnosticar o HPV e prevenir o câncer de ânus (GONÇALVES *et al.*, 2008; HERNANDEZ; MCDUFFIE, 2005; VÉO *et al.* 2008).

O câncer de ânus era considerado doença pouco freqüente, mas a sua incidência está crescendo, principalmente devido ao aumento do carcinoma de células escamosas (CCE). Em paralelo, tem sido constatado o aumento das infecções anogenitais por papilomavírus humano, que acomete 20% da população mundial sexualmente ativa (LINHARES; VILLA, 2000). A relação causal entre esse vírus e o câncer do colo do útero está bem caracterizada e o mesmo tem sido observado com o câncer de ânus (MAGI *et al.*, 2002; NADAL; MANZIONE, 2004; PALMER *et al.*, 1989; SHEPERD *et al.*, 1989; TACHEZY *et al.*, 2007). Esses fatos têm motivado a inclusão dessa doença como sexualmente transmissível, o que justifica a necessidade de adoção de medidas de vigilância nas clínicas de doenças sexuais, ginecológicas e urológicas (MARKOS, 2007; MONK; TEWARI, 2007).

Diagnóstico precoce e tratamento correto de todos os tipos de cânceres são fundamentais para a cura do paciente. O diagnóstico do câncer de ânus na fase inicial possibilita a cura sem a necessidade de tratamento cirúrgico. Isso significa vantagem para o paciente, principalmente quando considerado que nas fases avançadas a operação indicada é a amputação abdominoperineal, com conseqüências físicas e emocionais importantes para o doente.

Por causa da preocupação com possíveis neoplasias anais, alguns ginecologistas têm encaminhado pacientes sem imunodeficiências, com HPV genital, sem queixas anais para pesquisar infecção anal, mas com dúvidas sobre a validade da avaliação proctológica. Os dados disponíveis na literatura a respeito da concomitância de infecções nos diferentes sítios da região anogenital em mulheres HIV positivo são escassos, mais ainda em pacientes sem imunodeficiências, impedindo responder a esta questão com segurança (GONÇALVES *et al.*, 2008; PALESFSKY; SHIBOSKI; MOSS, 1994). Por isso, este trabalho se propôs a pesquisar a frequência do HPV anal em pacientes com infecção ginecológica por esse vírus e sem história de imunodeficiências. Caso seja verificado aumento significativo na frequência de infecção anal nas pacientes com HPV genital, esta pesquisa será importante para incluir o exame proctológico na rotina dos programas de saúde pública, com o intuito de prevenir a neoplasia anal.

2 OBJETIVOS

- Avaliar se as mulheres clinicamente imunocompetentes, sem evidências clínicas de doença anal e com NIC têm maior probabilidade de contaminação anal por este vírus
- Verificar se há concordância entre os subtipos de HPV encontrados nas regiões genital e anal em mulheres com neoplasia intra-epitelial
- Identificar os fatores que influenciam a ocorrência de HPV anal em mulheres com neoplasia intra-epitelial

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Papilomavírus humano

Os papilomavírus pertencem à família *Papillomaviridae* e ao gênero *Papillomavirus*. O capsídeo viral icosaédrico tem 50-55 nm de diâmetro, composto de 72 capsómeros formados por duas proteínas estruturais (L1 e L2), sendo que a primeira corresponde a 90% do conteúdo protéico do vírus. O seu genoma é constituído por 8.000 pares de bases distribuídos num duplo filamento circular e apenas o filamento positivo contém os genes principais: os dois genes estruturais tardios (L1 e L2) envolvidos na estrutura do capsídeo e sete ou oito genes funcionais precoces, dependendo do tipo viral (E1 a E8), relacionados com os processos de replicação. Esses vírus são tecidos e espécie específicos, que causam lesões celulares escamosas benignas e regressivas de pele e mucosa, na sua maioria benigna. O papilomavírus humano é reconhecido atualmente como o agente causal inequívoco de condilomas, neoplasias intra-epiteliais e carcinomas escamosos cervicais e anais (MONK; TEWARI, 2007; TROTTIER; FRANCO, 2006).

De acordo com seu potencial oncogénico, são caracterizados como de baixo ou alto risco de desenvolvimento de neoplasias. Cerca de 100 subtipos de HPV já foram identificados e mais de 40 deles estão associados a infecções anogenitais. Presume-se que o HPV infecte exclusivamente a camada basal do epitélio, por intermédio de microabrasões na sua arquitetura ou por contato direto com áreas receptivas altamente susceptíveis à infecção, dentro das zonas de transição epitelial existentes no colo do útero, epiglote, cordas vocais e ânus (PINTO, COLLAÇO, 2001; TACHEZY, 2007).

A maioria das infecções por HPV diagnosticadas por técnicas de hibridização molecular é transitória, uma vez que permanecem por não mais que um a dois anos. As infecções por vírus de alto risco de desenvolvimento de neoplasias parecem persistir por mais tempo que as causadas por vírus de baixo risco. Não se sabe se durante todo o período em que a infecção é encontrada o vírus pode ser transmitido para o parceiro sexual (TROTTIER; FRANCO, 2006).

3.1.1 Diagnóstico

A característica macroscópica da doença muitas vezes permite diagnóstico clínico quando se encontram lesões papilares, geralmente múltiplas, que podem se coalescer formando grandes tumores vegetantes. O diagnóstico microscópico dessas lesões também é possível, encontrando-se lesões com bordas bem definidas, constituídas por epitélio escamoso pluriestratificado, acantótico, com alongamento de cones epiteliais, que por vezes se dispõem sobre pedúnculo de tecido fibroconjuntivo. Outras vezes, observam-se células epiteliais de citoplasma volumoso, claro e com núcleos irregulares denominados coilócitos, que caracterizam a mudança morfológica induzida pelo HPV. São células maduras da camada intermediária ou da superfície do epitélio escamoso, caracterizadas por algumas anormalidades citológicas, como núcleo aumentado e hipercrômico, levemente irregular e circundado por larga zona clara citoplasmática (manchas). Nas margens dessa mancha, o citoplasma aparece bastante denso. O diagnóstico de certeza é dado pela presença do vírus nos tecidos, por meio de técnicas especiais como captura híbrida, imunistoquímica, hibridização *in situ* e reação em cadeia da polimerase (PCR). As condutas diagnósticas de rastreamento adotadas para infecções ginecológicas têm sido muitas vezes empregadas para as infecções anais (FOX, 2006).

Por ser a infecção anogenital por HPV um possível precursor de câncer, existe a preocupação em se realizar o seu diagnóstico por meio de rastreamento, com o objetivo de prevenir as transformações malignas, como já é realizado em ginecologia (FEY; BEAL, 2004; LÖRINCZ; RICHART, 2003). O rastreamento ideal em termos de custo-benefício é ainda tema controverso na literatura. A citologia é o método mais utilizado pelos ginecologistas, por ser mais acessível, mas, devido à possibilidade de resultado falso-negativo, pode ser indicado o teste de ácido desoxirribonucléico (DNA) para o HPV, mesmo sem citologia alterada (COX, 2006).

A citologia para diagnóstico dos precursores do câncer anal é considerada adequada por alguns autores que acreditam que este exame deva ser empregado como base de protocolos de rastreamento (FOX *et al.*, 2005; NADAL *et al.*, 2007). Outros autores, entretanto, a consideram de baixa especificidade, argumentando que, nos casos de citologia positiva, são necessários exames mais específicos, como anoscopia com magnificação de imagens e a coleta de fragmentos das áreas com alterações que sugerem a doença. Nesses espécimes, deve ser pesquisado o DNA do HPV por PCR para orientar o seguimento ao paciente, de acordo com a oncogenicidade do vírus encontrado (FOX *et al.*, 2005; ROKA

et al., 2008). Sempre que possível, deve ser pesquisado o subtipo do HPV, por meio de testes de DNA (hibridização e PCR), com o objetivo de se fazer rastreamento de precursores de neoplasias (LIE *et al.*, 2001)²¹ e, assim, aumentar os benefícios clínicos. A sensibilidade da combinação de citologia com PCR é de 96 a 100% para o diagnóstico de neoplasia intra-epitelial cervical graus dois e três e câncer (COX, 2006).

Os testes de DNA podem ser empregados no diagnóstico do HPV em proctologia, nas condições seguintes: triagem de pacientes com citologia oncológica sugerindo alterações atípicas das células escamosas de significância indeterminada (*Atypical squamous cells of undetermined significance* / alterações atípicas das células escamosas de significância indeterminada - ASCUS); marcadores de cura pós-tratamento; e, principalmente, como complemento da citologia nos programas de rastreamento do câncer (LÖRINCZ, 2003). Alguns autores relatam que, apesar de ser o exame mais específico existente na atualidade para diagnóstico etiológico do HPV, a PCR pode falhar em diagnosticá-lo em alguns casos, podendo variar de 63,6% em pacientes com alterações menores a 85% em casos de câncer invasivo (SOBIT *et al.*, 2002). Afirmam também que a ausência do vírus por este método não permite descartar o diagnóstico da doença viral (CALORE *et al.*, 2001; NADAL *et al.*, 2004).

3.1.2 Classificação das lesões causadas pelo HPV

O HPV causa lesões neoplásicas precursoras do carcinoma invasivo de células escamosas em ânus, região perianal, colo de útero, vagina, vulva e pênis. Essas lesões são classificadas como neoplasias intra-epiteliais graus I (leve), II (moderada) e III (grave) e estão associadas aos subtipos do HPV infectante. De acordo com a sua localização, são referidas com as abreviaturas seguintes: neoplasia intra-epitelial anal (NIA); neoplasia intra-epitelial perianal (NIPA); neoplasia intra-epitelial cervical (NIC); neoplasia intra-epitelial vaginal (NIVA); neoplasia intra-epitelial vulvar (NIV) e neoplasia intra-epitelial peniana (NIP).

3.1.3 Tratamento

Apesar das várias formas de tratamento das infecções pelo papilomavírus humano, as recidivas são frequentes e os resultados imediatos insatisfatórios, mas a cura é

possível quando o tratamento é repetido sempre que necessário (NATHAN, 2008). A escolha da terapêutica depende do tipo de lesão encontrada. Nas lesões maiores, o tratamento geralmente é cirúrgico, por meio de ablação por *laser*, eletrocauterização, coagulação das lesões com infravermelho, exérese das lesões e até mucossectomias (BONATTI *et al.*, 2007; FOX, 2006; FOX *et al.*, 2005; KREUTER *et al.*, 2008; STIER *et al.*, 2008). Nas lesões menores ou quando se pretende diminuir o tamanho das lesões objetivando um tratamento cirúrgico com menos morbidade, adota-se a aplicação tópica de ácido tricloroacético, podofilina, podofilotoxina e imunomoduladores (Imiquimod, Cidofovir).

3.1.4 Prevenção

A infecção anogenital pelo papilomavírus humano acontece por contato sexual, sendo o uso de preservativos indicado para a prevenção. A partir da recente liberação para uso clínico das vacinas contra quatro subtipos de HPV, 16, 18, 6 e 11, grande expectativa sobre a possibilidade de preveni-la, como acontece com outras doenças viróticas, vem acontecendo, inclusive com a sugestão de que a prevenção da infecção por meio da vacinação possa ser uma estratégia eficaz para prevenção dos cânceres anogenitais. Estudos têm sido realizados para avaliar o custo-benefício desse meio de prevenção na população de risco. Os resultados ainda não são conclusivos, sobretudo devido ao curto período de avaliação (CHESSON *et al.*, 2008; STANELY, 2007).

3.2 Associação entre papilomavírus humano e câncer

Estudos realizados nos Estados Unidos e Escandinávia relatam aumento acentuado na incidência de carcinoma de células escamosas (CCE) no ânus, nas últimas três décadas (BIØRGE, T. *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2002). Observou-se, também, crescimento concomitante da infecção por papilomavírus humano.

Palmer *et al.* (1987) estudaram a associação entre CCE de ânus e HPV subtipo 16, que é o mesmo vírus associado ao câncer e lesões pré-malignas de colo uterino. Cabrera *et al.* (1966) e Heselmeyer *et al.* (1997) sugeriram que a patogenia de transformação maligna na infecção por HPV no carcinoma de colo uterino e no de ânus é

similar. Com base nessas pesquisas, a infecção anal por HPV tem sido relacionada como agente causal mais importante do CCE de ânus e, dessa forma, essa neoplasia está sendo considerada doença sexualmente transmissível (BIØRGE, T. *et al.*, 2002.; CHANG *et al.*, 2002; FU *et al.*, 1998; GERD; GROSS, 1997; GERVAZ *et al.*, 2003; GOLDIE *et al.*, 1999; RAMANUJAN *et al.*, 1996; URONIS; BENDELL, 2007; WRIGHT JR.; RALPH, M.; RICHART, 1990).

Com o intuito de comprovar a correlação entre infecção por HPV e neoplasia anal, Varnai *et al.* (2006) estudaram 87 fragmentos de tumores de ânus e encontraram HPV em 80,9% dos carcinomas e 87,9% das neoplasias intra-epiteliais. Nos casos em que o HPV foi identificado, 86,8% eram do subtipo 16 (VARNAI *et al.*, 2006). A infecção persistente pelo papilomavírus humano é considerada fator de risco decisivo para o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas em ânus e região perianal. Deve ser levado em conta, entretanto, que a associação entre infecção por HPV e o aparecimento de tumores anais acontece em um contexto mais amplo do que a simples presença do vírus. Além do fator viral, são importantes os processos inflamatórios crônicos anorretais que, associados à imunodepressão, podem acelerar a divisão celular e dar origem à neoplasia (NADAL; MANZIONE, 2004). Esse mecanismo ocorre pela ação dos genes E6 e E7 dos vírus, que são considerados oncogenes e agem por inativação de duas oncoproteínas vitais no ser humano, P53 e pRb (supressoras tumorais) durante as primeiras fases do ciclo celular. Na seqüência, ocorre ruptura dos sinais em cascata, que normalmente restringe a proliferação celular até a sua linha basal (LU; EL-MOFTY; WANG, 2003; SOBIT *et al.*, 2003).

A incidência do câncer de ânus atinge proporções epidêmicas nos homossexuais masculinos (35 casos por 100.000 hab), sendo ainda mais alarmante na população com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). As lesões intra-epiteliais também têm sido encontradas em número elevado nos pacientes masculinos homossexuais HIV negativo (MC CLOSKEY; METCALF, 2007) e em mulheres HIV negativo, cuja explicação pode estar relacionada a três fatores: infecção por vírus dos subtipos oncogênicos; maior número de coitos anais que o relatado; e contaminação oriunda de infecção genital (CHANG *et al.*, 2002; MASSAD *et al.*, 1999).

Segundo Daling *et al.* (1987), de 148 pacientes com neoplasia anal estudados, 41,7% dos homossexuais masculinos, 28,6% de homens heterossexuais e 28,3% das mulheres tinham história positiva de verrugas anais. Goldie *et al.* (1999) afirmaram que a incidência de CCE de ânus é maior entre homens homossexuais e bissexuais do que o

câncer do colo uterino nas mulheres e maior ainda entre pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida.

Scholefield *et al.* (1989) relataram que de 28 mulheres com HPV anal, 10 tinham neoplasia intra-epitelial em colo de útero e, dentre elas, cinco tinham também neoplasia intra-epitelial anal (NIA). Por outro lado, nenhuma paciente sem NIC apresentava NIA, fazendo-se, assim, um paralelo entre a doença genital e a anal. A área do epitélio anogenital infectada pelo HPV favorece o acometimento das áreas adjacentes pela dispersão do agente, criando um campo de epitélio suscetível a transformações neoplásicas (SCHOLEFIELD *et al.*, 1994). Devido a essa susceptibilidade, pacientes com HPV genital, mesmo sem queixas, podem apresentar infecção anal. Esse fato sugere a necessidade de melhor entrosamento entre as duas especialidades, para que as pacientes com afecções genitais causadas pelo papilomavírus humano sejam também examinadas por coloproctologista (BOSTJAN, 2006; MLAKAR, 2007; O'MAHONY, 2007).

Apesar da incidência de câncer de ânus em mulheres ter aumentado quase 40%, nenhuma normatização em relação ao rastreamento das mesmas foi proposto (CHANG *et al.*, 2002). Hayanga (2006) e Hernandez e McDuffie (2005) examinaram espécimes de colo uterino e ânus de 1.566 mulheres e relataram que a infecção anal por HPV é comum, com prevalência comparável à infecção do colo do útero de mulheres saudáveis e sexualmente ativas (HERNANDEZ; McDUFFIE, 2005). Melbye e Sprøgel (1991) estudaram 29.648 pacientes do Registro Nacional de Câncer da Dinamarca e constataram que as com neoplasia de ânus tiveram mais diagnósticos prévios de neoplasias intra-epiteliais ou câncer invasivo em colo de útero do que aquelas com câncer de cólon ou estômago, concluindo haver fatores de risco relacionados entre as neoplasias anais e de colo de útero.

Entre os fatores de risco de infecção por HPV em ânus e desenvolvimento de neoplasias, foram considerados importantes o tabagismo, o comportamento sexual, o subtipo do papilomavírus e o estado imunológico da paciente, principalmente quando presente a SIDA com contagem de CD4 $<200/\text{mm}^3$ (FU *et al.*, 1998; LINHARES *et al.* 2000; PALESFSKY; SHIBOSKI; MOSS, 1994; RYUZABURO; TETSUYA; REIKO, 2006).

4 CASUÍSTICA E MÉTODO

Trata-se de estudo prospectivo sobre a presença de HPV anal em 52 mulheres com NIC, atendidas no Hospital Mário Pena e Ambulatório Carlos Chagas do Hospital das Clínicas da UFMG, no período janeiro a dezembro de 2007. O projeto deste estudo e o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A) foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP – parecer nº ETIC 394/07 e Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Mário Pena – parecer nº 17/2005 (ANEXO A).

4.1 Casuística

4.1.1 Avaliação clínica e exames laboratoriais

As pacientes foram avaliadas por meio de anamnese e exame físico, incluindo exame ginecológico e proctológico. Os objetivos foram a pesquisa de doenças preexistentes e atuais, além da procura por informações relacionadas com o estudo, tais como: tabagismo, paridade, início das atividades sexuais, número de parceiros, coito e/ou manipulação anal e doença ginecológica, ou seja, queixas e hábitos que pudessem estar relacionados com a infecção anal por HPV. Foram realizados o exame físico de rotina, exame ginecológico e proctológico; todos os questionários com dados das pacientes foram feitos sempre pela pesquisadora (APÊNDICE B).

4.1.2 Critérios de inclusão

Foram incluídas na pesquisa as pacientes com as características seguintes:

- Diagnóstico de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) confirmados por exame anatomopatológico;
- ausência de sinais e sintomas compatíveis com HPV anal.

4.1.3 Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo as pacientes com as características seguintes:

- Prurido, verrugas e/ou lesões com características de HPV evidentes à inspeção anal;
- uso de imunossupressores;
- diagnóstico de imunodeficiência de qualquer etiologia;
- sensibilidade à lidocaína;
- gestantes;
- procedimentos cirúrgicos em ânus nos três meses anteriores;
- recusa em participar da pesquisa.

4.1.4 Características gerais da amostra

O estudo incluiu 52 mulheres com idades entre 16 e 72 anos (mediana de $39 \pm 16,0$), sendo nove (17,3%) negras, 12 (23,0%) pardas e 31 (59,7%) brancas. As pacientes tiveram, em média, dois parceiros durante o tempo de atividade sexual. A paridade variou entre nulípara e 10 partos (média de $2,1 \pm 2,0$ partos). Oito (15,4%) eram tabagistas e 16 (30,8%) usavam contraceptivos hormonais. A prática de coito anal foi confirmada por 18 (34,6%) mulheres e manipulação anal por 19 (36,5%). A doença ginecológica mais diagnosticada foi NIC 1, com 67,3%, seguida de NIC 3, com 21,2%, e NIC 2 em 11,5% das pacientes (TAB. 1).

TABELA 1
Características gerais, categoria e número de casos

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	CASOS
Início vida sexual		18,00 ($\pm 4,00$)
Número de parceiros		2,00 ($\pm 2,50$)
Número de parceiros (último ano)		1,00 ($\pm 0,00$)
Paridade		2,00 ($\pm 2,00$)
Tabagismo	Não	84,6%
	Sim	15,4%
Contraceptivo	Não	69,2%
	Sim	30,8%
Terapia hormonal	Não	100,0%
	Sim	0,0%
Coito anal	Não	65,4%
	Sim	34,6%
Manipulação anal	Não	63,5%
	Sim	36,5%
Doença ginecológica	NIC 1	67,3%
	NIC 2	11,5%
	NIC 3	21,2%

As variáveis quantitativas estão expressas em termos da mediana e intervalo interquartil, pois o teste K-S indicou desvio da normalidade.

4.2 Métodos

4.2.1 Exames ginecológico e proctológico

As pacientes eram examinadas pelo ginecologista e depois pela coloproctologista (mesma profissional em todas as coletas) e em ambos os exames empregou-se a colposcopia, incluindo-se a magnificação de imagens da região anal e perianal, com a supervisão do ginecologista.

Nesses exames foram usados os seguintes materiais:

- Mesa ginecológica;

- escova cervical *Kolplast*®;
- vídeocolposcópio *Welch Ally*®
- anuscópio descartável *Kolplast*®;
- lidocaína gel a 2% como lubrificante;
- cloreto de sódio a 0,9%;
- ácido acético a 3%;
- pinça de biópsia tipo Cherron;
- cloridrato de lidocaína a 2%, sem vasoconstritor, tubetes de 1,8 mL;
- seringa Carbule (odontológica);
- agulha gengival 27 G longa;
- frasco com formol a 10%;
- gazes.

4.2.1.1 Exame ginecológico

- Paciente em posição de litotomia;
- introdução do espéculo vaginal e exposição do colo uterino;
- coleta de material para pesquisa do HPV em colo uterino com escova cervical (dentro do canal e em torno do mesmo externamente em sentido horário) e acondicionamento do mesmo em solução salina, que foi encaminhado ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da Faculdade de Medicina da UFMG, para a realização do exame de PCR;
- aplicação de solução de ácido acético a 3% sobre o colo uterino;
- aplicação de solução de Schiller para identificação de áreas iodo-negativo ;
- aplicação de solução de bissulfito de sódio a 5% para descolorir o colo;
- reaplicação de ácido acético a 3% e exame com colposcópio para pesquisar possíveis áreas acetobranças, pontilhados, mosaicos e vascularização atípica.

4.2.1.2 Exame proctológico

- Paciente em posição de litotomia, sem preparo intestinal;

- inspeção da região anal e perianal;
- coleta de material para pesquisa do HPV em canal anal, empregando-se escova cervical e acondicionamento da mesma em solução salina, que foi encaminhado ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da Faculdade de Medicina da UFMG para a realização do exame de PCR;
- toque retal para identificação de possíveis lesões;
- introdução do anuscópio lubrificado com lidocaína geléia a 2% até aproximadamente 6 cm da borda anal para exame do ânus e reto distal;
- exame da região anal e reto inferior mediante a retirada lenta do anuscópio para observarem-se coloração e alterações na sua superfície;
- reintrodução do anuscópio, limpeza da região anal e perianal com solução salina a 0,9%;
- aplicação de ácido acético a 3% para corar as possíveis áreas alteradas e exame da mesma região, empregando-se o colposcópico;
- as áreas acetobranças eram anestesiadas com cloridrato de lidocaína a 2% e colhidos fragmentos para o exame anatomopatológico, com pinça de Cherron;
- inspeção da região perianal;
- coloração da área perianal com ácido acético a 3%;
- exame da área com colposcópico;
- áreas acetobranças identificadas foram anestesiadas com cloridrato de lidocaína e coletados fragmentos com pinça de Cherron, que foram enviados para exame anatomopatológico em solução de formalina a 10%.

4.2.2 Técnica da tipagem do HPV pelo PCR

4.2.2.1 Extração do DNA

- Colocado em tubo Eppendorf de 1,5 mL no máximo 1 cm² de tecido + 500 µL de *buffer* de lise (10 mM TRIS HCL; 5mM EDTA; 0,2% SDS; 200 mM NACL e 100 µg/mL de proteinase K);
- incubado a 55°C com agitação durante 2-3 horas;
- centrifugado durante cinco minutos a 2,500 rotações por minuto (rpm) e

recolhido o sobrenadante;

- pipetado o volume total recolhido num tubo contendo 500 μL de isopropanol. Misturado e agitado até completa precipitação do DNA. Não utilizado vórtex;
- centrifugado brevemente, quando necessário, e descartado o sobrenadante;
- dissolvido o *pellet* em 20 μL a 500 μL de *buffer* TE (10 mM TRIS HCL; 1mM EDTA; ph 7).

Ajustou-se o volume de TE no final do procedimento, dependendo do tamanho do *pellet*. Para dissolução do mesmo, pode ter sido necessário o período de incubação a 37°C por uma ou duas horas.

4.2.2.2 Tipagem do HPV por PCR alelo-específico

O DNA das amostras foi amplificado com iniciadores específicos para os HPVs subtipo 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35.

4.2.2.3 Condições da reação de PCR

Mix da reação:

H₂O – 33,5 μL

Buffer – 5,0 μL

DNTP's – 1,0 μL

Primer – 5,0 μL

Enzima – 0,5 μL

Alíquota/tubo – 45 μL

DNA – 5 μL

4.2.2.4 Programa para amplificação no termociclador

94°C – 1’	X– 2’ (temperatura de anelamento específica para cada tipo)
90°C – 2’’-----	16, 31 e 35: 54°C – 2’
X - 2’’----- 30X	33: 50°C – 2’
72°C – 1’-----	18: 58°C – 2’
	11: 61°C – 2’
	6: 56°C – 2’
72°C ~ 10’	
4°C ~ infinito	

4.2.2.5 Condições da eletroforese

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, tratado com brometo de etídio. Foram adicionados ao produto da PCR 5 µL de corante e aplicados 20 µL no gel + 20 µL do padrão de peso molecular. A corrida eletroforética foi realizada a 200 v durante 45 minutos e o resultado foi observado através de um transluminador de luz ultravioleta (UV).

Preparação do gel de agarose a 2%:

- 6g de agarose
- 300 mL de solução TBE 5X
- 3 µL de brometo de etídio
- aproximadamente 30’ para polimerização

Preparação da solução TBE 10X

- 215,6 g de Tris
- 90 g de ácido bórico
- 14,88 g de EDTA
- completado para 2 litros de água

4.2.3 Técnica do exame anatomopatológico

No laboratório de anatomia patológica o espécime foi processado em processador automático de tecido, incluído em parafina e submetido a cortes semi-seriados de 5 μm , por meio de micrótomo rotativo. Foram preparadas lâminas com o material dos cortes e desparafinadas em estufa a 70°C, banhadas com xilol, seguido de banhos com álcool absoluto e álcool a 70° e água corrente por cinco minutos. Em seguida, procedeu-se à coloração dos cortes por meio de infusão em hematoxilina por dois a cinco minutos e depois lavagem com água corrente, coloração com eosina por dois minutos e banhos de água corrente.

O espécime foi fixado na lâmina, por desidratação, em banhos crescentes de álcool (70°, 80° e absoluto), seguido de álcool aquecido em estufa a 35°C e submetido a banho de xilol quente, acompanhado de dois banhos de xilol frio. A montagem da lâmina foi concluída com colocação de lamínula de vidro para exame em microscópio de luz.

4.2.4 Variáveis estudadas e testes estatísticos

Foram avaliadas as seguintes variáveis:

- Frequência de HPV anal na presença de neoplasia intra-epitelial cervical expressa em porcentagem pelo teste de qui-quadrado;
- frequência e subtipos de HPV anal em mulheres com NIC e sem evidências de doença anal expressa em porcentagem e teste de qui-quadrado;
- influência de fatores como início de atividade sexual, número de parceiros, paridade, tabagismo, uso de contraceptivo oral ou reposição hormonal, coito anal, manipulação anal e tipo de doença ginecológica na ocorrência de HPV anal em mulheres com NIC, por meio de regressão logística (análise bivariada).

Os questionários preenchidos foram revisados, tendo as suas informações codificadas e digitadas em banco de dados no programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) para Windows versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), que desenvolveu os cálculos posteriores.

A frequência dos resultados foi analisada, em termos probabilísticos, por meio do teste do qui-quadrado, de acordo com o método descrito por Soares e Siqueira (1999), uma vez que as variáveis são dicotômicas e não-paramétricas. Fixou-se o nível de significância em $p < 0,05$, para aceitar as diferenças entre os grupos do experimento.

O número de pacientes estudadas representa uma amostra considerada significativa para o estudo da prevalência do HPV anal em pacientes com infecção em colo de útero.

5 RESULTADOS

5.1 Presença de HPV anal em mulheres com infecção genital por este vírus

Das 52 mulheres, o HPV foi diagnosticado na região anal e colo uterino em 23 (44%). Em 16 (31%) esse vírus foi diagnosticado apenas no colo uterino; em duas (4%) apenas no ânus; e em 11(21%) não foi diagnosticado HPV em nenhuma das duas regiões. A análise estatística mostrou associação significativa entre a presença do HPV anal e no colo uterino ($p=0,008$). Considerando-se o risco relativo, pode-se afirmar que a paciente com HPV na região do colo do útero tem 3,83 vezes mais probabilidade de ter o vírus também na região anal do que as sem essa infecção (FIG. 1).

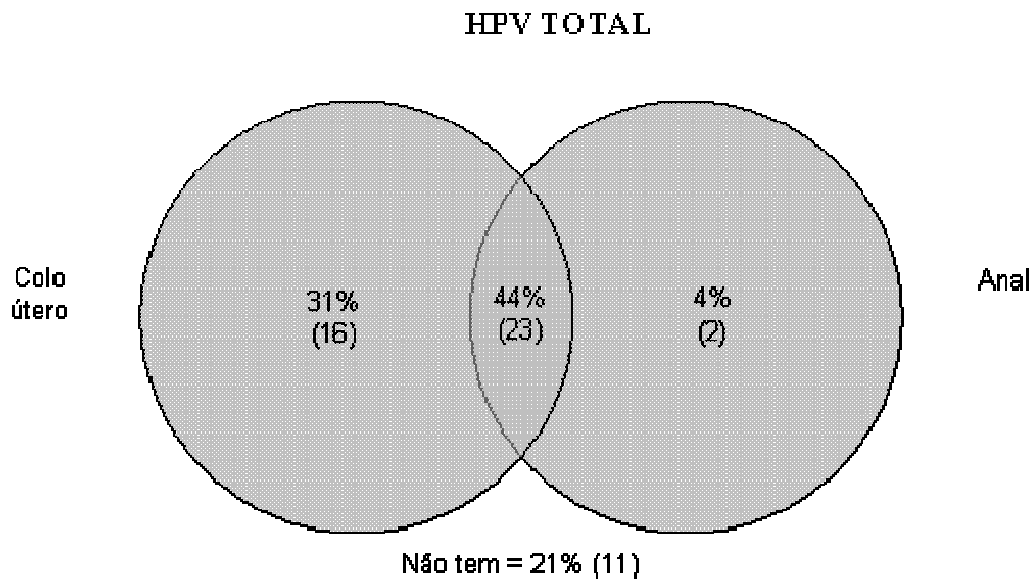


FIGURA 1 - Pesquisa do HPV na região anal e colo uterino em mulheres com NIC (n=52)

HPV – Papilomavírus humano, NIC – Neoplasia intra-epitelial cervical
 Associação HPV anal vs. HPV colo uterino: $p=0,008$ (teste qui-quadrado)

5.2 Frequência e subtipos de HPV anal em mulheres com NIC e sem evidências de doença anal

Das 25 pacientes com HPV no ânus, em 19 não foram identificados os subtipos do vírus e, naqueles identificados, o subtipo mais prevalente foi o HPV 6. Em três delas foram identificados dois subtipos em cada, 6 e 35, 6 e 31, 31 e 35. Das 39 mulheres com HPV no colo uterino, o subtipo do vírus foi identificado em 18, sendo o mais prevalente o subtipo 16, seguido dos de números 6, 31, 33, 35 e 18 (TAB. 2, FIG. 1).

TABELA 2

Presença do HPV e seus subtipos e a frequência encontrada na região anal e colo uterino de mulheres com NIC

HPV E SUBTIPOS	PRESENÇA	ANAL		COLO UTERINO	
		N	PERCENTUAL	N	PERCENTUAL
HPV	Não	27	51,9% ($\pm 13,6\%$)	13	25,0% ($\pm 11,8\%$)
	Sim	25	48,1% ($\pm 13,6\%$)	39	75,0% ($\pm 11,8\%$)
HPV 6	Sim	5	9,6% ($\pm 8,0\%$)	5	9,6% ($\pm 8\%$)
HPV 11	Sim	0	0,0% ($\pm 0,0\%$)	1	1,9% ($\pm 3,7\%$)
HPV 16	Sim	0	0,0% ($\pm 0,0\%$)	11	21,2% ($\pm 11,1\%$)
HPV 18	Sim	0	0,0% ($\pm 0,0\%$)	1	1,9% ($\pm 3,7\%$)
HPV 31	Sim	3	5,8% ($\pm 6,3\%$)	4	7,7% ($\pm 7,2\%$)
HPV 33	Sim	1	1,9% ($\pm 3,7\%$)	4	7,7% ($\pm 7,2\%$)
HPV 35	Sim	2	3,8% ($\pm 5,2\%$)	2	3,8% ($\pm 5,2\%$)
HPV	Id. ou negativo	33	63,5% ($\pm 13,1\%$)	31	59,6% ($\pm 13,3\%$)
	Não identificado	19	36,5% ($\pm 13,1\%$)	21	40,4% ($\pm 13,3\%$)

HPV – Papilomavírus humano, NIC – Neoplasia intra-epitelial cervical.

N é o número de casos absolutos para cada categoria de resposta. Os resultados mostram a proporção de casos e o intervalo de confiança da proporção (95% de confiança).

Para HPV ausente, o percentual mostrado foi calculado considerando-se a amostra total. Se se tomarem somente os casos positivos para HPV na região analisada,

têm-se 76% (19/25), não identificado o subtipo para a região anal, e 54% (21/39) na região do colo uterino.

Entre as 52 pacientes, o HPV foi identificado concomitantemente nas regiões anal e genital em 23 (44%) delas. Dos sete subtipos de vírus pesquisados, foi verificada a concordância nas duas regiões em quatro (17,39%) mulheres, sendo eles de números 6, 31, 33 e 35 (TAB. 3).

TABELA 3

Co-ocorrência dos subtipos de HPV na região anal e colo uterino em mulheres com NIC

		COLO UTERINO							
SUBTIPO		HPV	HPV 6	HPV 11	HPV 16	HPV 18	HPV 31	HPV 33	HPV 35
ANAL	HPV	44% (23)	6% (3)	-	12% (6)	2% (1)	2% (1)	6% (3)	4% (2)
	HPV 6	10% (5)	2%(1)	-	2% (1)	-	-	-	2% (1)
	HPV 11	-	-	-	-	-	-	-	-
	HPV 16	-	-	-	-	-	-	-	-
	HPV 18	-	-	-	-	-	-	-	-
	HPV 31	6% (3)	-	-	2% (1)	2% (1)	2% (1)	-	2% (1)
	HPV 33	2% (1)	-	-	-	-	-	2% (1)	0% (0)
	HPV 35	4% (2)	2% (1)	-	2% (1)	2% (1)	-	-	2% (1)

HPV – Papilomavírus humano, NIC – Neoplasia intra-epitelial cervical, - igual a 0% (0).

O valor fora dos parênteses mostra o percentual de casos que apresentam os subtipos do vírus de maneira conjunta. O valor dentro dos parênteses indica o número de co-ocorrências na amostra.

Na análise estatística entre as co-ocorrências dos subtipos virais nas 23 mulheres nas quais foi diagnosticado o vírus nos dois locais, não houve diferença significativa entre os mesmos. A diferença significativa foi encontrada somente quanto à presença do HPV ($p < 0,01$) - (TAB. 4).

TABELA 4
Associação entre subtipos do HPV em mulheres com NIC

		COLO UTERINO							
SUBTIPO	HPV	HPV 6	HPV 11	HPV 16	HPV 18	HPV 31	HPV 33	HPV 35	
ANAL	HPV	7,42 (0,01)	0,32 (0,66)	0,94 (1,00)	0,23 (0,74)	1,1 (0,48)	0,92 (0,61)	1,26 (0,34)	2,25 (0,23)
	HPV 6	1,84 (0,31)	0,69 (0,41)	0,11 (1,00)	0,00 (1,00)	0,11 (1,00)	0,46 (1,00)	0,46 (1,00)	3,90 (0,18)
	HPV 11	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
	HPV 16	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
	HPV 18	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
	HPV 31	1,06 (0,56)	0,34 (1,00)	0,06 (1,00)	0,28 (1,00)	16,65 (0,06)	2,95 (0,22)	0,27 (1,00)	7,49 (0,11)
	HPV 33	0,34 (1,00)	0,11 (1,00)	0,02 (1,00)	0,27 (1,00)	0,02 (1,00)	0,08 (1,00)	12,24 (0,08)	0,04 (1,00)
	HPV 35	0,69 (1,00)	3,90 (0,18)	0,04 (1,00)	1,04 (0,38)	25,49 (0,04)	0,17 (1,00)	0,17 (1,00)	11,98 (0,08)

HPV – Papilomavírus humano, NIC – Neoplasia intra-epitelial cervical.

A associação entre subtipos do HPV foi feita pelo teste do qui-quadrado e significância exata.

O valor fora dos parênteses mostra o valor da estatística qui-quadrado para as co-ocorrências na amostra. O valor dentro dos parênteses indica a significância exata da associação.

5.3 Fatores que influenciaram a ocorrência de HPV anal em mulheres com NIC

Entre os fatores pesquisados, houve associação significativa nas variáveis paridade ($p=0,02$) e número de parceiros ($p=0,04$), ou seja, o maior número de filhos e de parceiros aumenta a chance de a mulher contrair o papilomavírus humano anal. Nas demais variáveis, os resultados não foram significantes (TAB. 5).

TABELA 5

Variáveis estudadas na infecção de HPV na região anal em mulheres com NIC

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	HPV ANAL		p	OR	INTERVALO	
		AUSENTE	PRESENTE			LI	LS
Tabagismo	Não	93% ($\pm 10\%$)	76% ($\pm 17\%$)		1,00		
	Sim	7% ($\pm 10\%$)	24% ($\pm 17\%$)	0,12	3,95	0,72	21,78
Paridade		1,52 ($\pm 0,38$)	2,76 ($\pm 0,86$)	0,02	1,72	1,09	2,71
Início atividades sexuais		19,41 ($\pm 1,83$)	17,12 ($\pm 1,43$)	0,07	0,88	0,76	1,01
Número de parceiros		2,22 ($\pm 0,49$)	3,60 ($\pm 1,06$)	0,04	1,47	1,01	2,13
Manipulação anal	Não	56% ($\pm 19\%$)	72% ($\pm 18\%$)		1,00		
	Sim	44% ($\pm 19\%$)	28% ($\pm 18\%$)	0,22	0,49	0,15	1,55
Coito anal	Não	56% ($\pm 19\%$)	76% ($\pm 17\%$)		1,00		
	Sim	44% ($\pm 19\%$)	24% ($\pm 17\%$)	0,13	0,39	0,12	1,30
Coito anal e/ou manipulação anal	Não	56% ($\pm 19\%$)	72% ($\pm 18\%$)		1,00		
	Sim	44% ($\pm 19\%$)	28% ($\pm 18\%$)	0,22	0,49	0,15	1,55
Doença ginecológica	NIC 1	81% ($\pm 15\%$)	52% ($\pm 20\%$)	0,05	0,22	0,05	0,99
	NIC 2	7% ($\pm 10\%$)	16% ($\pm 14\%$)	0,79	0,75	0,09	6,47
	NIC 3	11% ($\pm 12\%$)	32% ($\pm 18\%$)	0,09	1,00		

HPV – Papilomavírus humano, NIC – Neoplasia intra-epitelial cervical.

OR: *odds ratio*; LI: limite inferior de confiança (95%); LS: limite superior de confiança (95%); p: significância (valor p) da relação.

Os dados estão expressos em relação à média e intervalo de confiança da média. Para as proporções, apresenta-se dentro dos parênteses o intervalo de confiança das mesmas.

A associação dos fatores de risco com a presença do HPV anal foi feita pela regressão logística (análise bivariada).

6 DISCUSSÃO

As mulheres participantes do presente estudo foram selecionadas a partir de diagnóstico prévio ou atual de neoplasia intra-epitelial cervical graus I, II e III (NIC I, II ou III). As que compareceram à consulta para controle de tratamento prévio de NIC (qualquer grau, comprovado anteriormente por biópsia) foram incluídas na amostra quando o exame por magnificação de imagens diagnosticou a persistência de lesões compatíveis com doença por HPV. Foi também pesquisada a ocorrência de sete diferentes subtipos virais quando o HPV estava presente nos locais pesquisados - colo de útero e ânus; a influência de fatores que poderiam estar colaborando para a presença da infecção e a concordância entre a infecção anal e cervical dos subtipos do vírus, quando encontrado, também foi avaliada. As pacientes foram questionadas a respeito de uso de imunossupressores, história clínica de infecções e incluídas quando não havia dados sugerindo imunodeficiências.

A frequência dos resultados obtidos foi analisada, em termos probabilísticos, por meio do teste do qui-quadrado, de acordo com o método descrito por Soares e Siqueira (1999), uma vez que as variáveis são dicotômicas, não-paramétricas. O teste qui-quadrado, empregado para avaliar a associação entre variáveis de nível nominal, verifica se a associação encontrada entre duas variáveis não é devida a erros amostrais. Testa-se a hipótese (nula) de que as variáveis são independentes: valores significativos ($p < 0,05$) indicam que existe associação entre as variáveis; e valores não-significativos ($p > 0,05$) indicam que as relações observadas são devidas a erros amostrais. O teste é válido para tabelas em que no máximo 20% das células tenham frequência esperada superior a cinco e que nenhuma tenha frequência esperada inferior a um (MOEGAN; GRIEGO, 1998; PESTANA; GAGUEIRO, 2000; TABACHINIK; FIDELL, 2001). Para tabelas 2x2, é costume não realizar o teste quando uma célula tiver frequência esperada menor que cinco. Nas condições em que tal suposição foi violada, aplicou-se o teste exato da estatística, que não faz suposição acerca da frequência esperada dos casos. Fixou-se o nível de significância em ($p < 0,05$) para aceitar as diferenças entre os grupos do experimento.

Dos métodos disponíveis para rastreamento do HPV, a citologia é muito usada, pela possibilidade de diagnosticar alterações, mas é de baixa especificidade e tem até 50% de resultados falso-negativos (Tavares *et al.* 2007). Quando a citologia se encontra alterada, são necessários outros métodos para a confirmação do diagnóstico. Fox *et al.* (2005)

encontraram sensibilidade e especificidade na coleta anal similar à da citologia de colo uterino. Esses autores preconizaram o uso da citologia anal como base de um projeto-piloto de rastreamento em centros de pacientes HIV positivo e, em seguida, a anuscopia com biópsias das lesões encontradas. Nadal *et al.* (2007) propuseram o uso da citologia anal como método de rastreamento da população para prevenir ou tratar os precursores do câncer de ânus.

Entre os métodos de detecção molecular do DNA do vírus do HPV, podem ser destacadas a hibridização *in situ*, a captura híbrida, que revela a presença quantitativa do mesmo, e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Hubbard (2003) e Do Carmo e Fiorini (2007) consideraram a PCR o método de maior sensibilidade, sendo capaz de identificar o vírus em reduzida quantidade de amostras e também de permitir a verificação de infecções por múltiplos subtipos, bem como avaliar o risco oncogênico da população viral infectante.

Diante dessas afirmações, definiu-se para a presente pesquisa que o melhor método para identificar a presença dos vírus é a PCR, que é referido na literatura como o mais adequado para o correto diagnóstico etiológico do HPV (CALORE *et al.*, 2001). Para a coleta de material do canal anal para o exame de PCR, empregou-se escova de citologia vaginal, tendo sido referido desconforto tolerável pelas pacientes. O exame diagnosticou primeiramente se o vírus estava presente no colo do útero e região anal e, em caso afirmativo, se eram dos subtipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 ou 35 ou diferente deles. De acordo com estudo realizado por Sobti *et al.* (2002), o diagnóstico do HPV por esse método pode ser variável em até 85% nos casos de câncer cervical invasivo e 63,6% nas alterações menores. Calore *et al.* (2001) e Nadal *et al.* (2004) preconizaram que as técnicas de detecção molecular do HPV podem evidenciar o vírus em até 75% dos casos e que, por isso, a ausência do vírus por esses métodos não permite descartar o diagnóstico de doença viral.

Das 52 mulheres estudadas, foi diagnosticado HPV na região anal concomitantemente à detecção em colo uterino em 23 delas (44%), mostrando significância da existência do vírus nessa região quando havia lesões ginecológicas induzidas por eles ($p=0,008$). Em 16 mulheres (31%), o HPV foi diagnosticado somente no colo uterino e duas (4%) o tinham apenas no ânus. Em 11 (21%) pacientes não foi detectado HPV no colo uterino e ânus. Não foi encontrada na literatura pesquisa relacionada especificamente com esses resultados, para efeito de comparação.

A fim de atestar o tamanho da amostra requerida, procedeu-se a cálculos de poder amostral para a associação entre HPV nas duas regiões estudadas e para o modelo

logístico considerado. O poder da amostra utilizada, quando considerado para avaliação da presença de qualquer tipo do vírus nas duas regiões (HPV anal e no colo uterino), foi de 78%, bem próximo do limite usual, de 80%, considerando-se o nível 95% de confiança. Mesmo sendo menor a concomitância da infecção anal e ginecológica nas pacientes deste estudo do que o relatado na literatura nas mulheres HIV+, ficou demonstrado que a probabilidade de as mulheres com HPV ginecológico terem o vírus no ânus é 3,83 vezes maior do que daquelas sem a infecção no colo do útero.

Gonçalves *et al.* (2008) encontraram, em pacientes com deficiência imunológica, a concomitância da infecção nos dois sítios em até 68% dos casos, relatando que, comparado às mulheres HIV negativo, as HIV positivo têm mais infecções por múltiplos subtipos de HPV e relativamente menor incidência de infecção pelo subtipo 16. Esses autores ressaltaram, ainda, a pouca informação disponível a respeito da prevalência da concomitância da infecção pelo HPV nos diferentes sítios da região anogenital em mulheres HIV negativo. Tachezy *et al.* (2007) correlacionaram a histologia e detecção do HPV por PCR em pacientes com tumores em canal anal. Encontraram fragmentos de lesões morfológicas típicas de infecção por HPV sem conseguirem diagnosticar o DNA do vírus pela PCR e os consideraram *burned out*, de acordo com a classificação de tumores do sistema digestivo da WHO (2000).

A pesquisa dos subtipos virais nas regiões genital e anal mostrou concordância baixa, sem significância pelo teste de qui-quadrado. Uma hipótese para explicar esse fato pode estar relacionada com o tropismo do vírus. Assim como existem subtipos de vírus diferentes que acometem pele, mucosa e outros tecidos, o mesmo pode ocorrer nas regiões genitais e anais. Variação também pode ser encontrada devido a diferenças entre faixas etárias e até por variações geográficas. É necessário, entretanto, maior número de pacientes para se confirmar esta hipótese. Burchell *et al.* (2006) relataram esse fato em estudo sobre a epidemiologia do HPV direcionado para a dinâmica da transmissão sexual em populações da África, América, Europa e Ásia. Em pacientes com SIDA, é descrita maior concordância entre os subtipos encontrados em colo uterino, vagina e ânus, sendo maior a concordância entre colo uterino e vagina.

A magnificação de imagens em canal anal por meio do colposcópico, além de ser um método que ainda carece de padronização das imagens encontradas, como existente para o aparelho genital feminino, também necessita de outros exames para diagnóstico de certeza. Palefsky *et al.* (1997) recomendaram o seu uso em canal anal para orientar biópsias quando a citologia diagnosticar alterações. O colposcópico tem sido empregado

para diagnosticar áreas sugestivas de alterações por HPV no canal anal e região perianal (MAGI *et al.*, 2002; SCHOLEFIELD *et al.*, 1994). Jay *et al.* (1997) utilizaram a magnificação de imagem e parâmetros usados na colposcopia ginecológica em canal anal em 152 homens nos quais realizaram 358 biópsias. Concluíram que as imagens encontradas nos diferentes graus de neoplasias intra-epiteliais evidenciadas eram similares àquelas descritas em colo uterino. As alterações passíveis de serem encontradas ainda não foram padronizadas, como o é na ginecologia. Os padrões empregados no exame ginecológico têm sido usados, quando possível, bem como biópsia das áreas suspeitas para confirmação do diagnóstico e pesquisa de possíveis neoplasias.

Com o objetivo de se adquirir experiência com método novo em proctologia, o coloscópio foi usado no exame da região anal de todas as pacientes, em seguida ao exame ginecológico, com supervisão e orientação do ginecologista. Em apenas um caso identificaram-se alterações compatíveis com HPV, cuja biópsia mostrou tratar-se de lesão compatível com papilomavírus, porém sem atipia celular. Foram detectados nessa paciente o vírus 16 no colo uterino e HPV no ânus, entretanto, diferentes dos sete subtipos pesquisados.

No presente trabalho, foram pesquisados fatores considerados determinantes da presença do papilomavírus humano no ânus, todavia, os resultados foram significantes somente quanto à paridade e ao número de parceiros. Os demais fatores, como início da atividade sexual, tabagismo, uso de contraceptivo oral ou reposição hormonal, coito anal, manipulação anal e o tipo de doença ginecológica, não tiveram resultados significantes. Considerando-se que o poder de teste do modelo logístico ficaria bastante reduzido caso fosse feito um modelo multivariado, preferiu-se não realizá-lo neste estudo, evitando-se, deste modo, incorrer em redução ainda maior da chance de se detectarem efeitos significativos. Esperava-se que o coito e a manipulação anal fossem importantes para a infecção do HPV anal, como relatado por Moscicki *et al.*, já em 1999, e posteriormente por Gervaz *et al.* (2003), Burchell *et al.* (2006) e Trottier e Franco (2006), mas os resultados dessas duas variáveis não foram significantes. Essa divergência de resultados pode ter como explicação o fato das pacientes da presente pesquisa se sentirem inibidas em responder sobre sua intimidade sexual em ambiente com pouca privacidade, como ocorre em ambulatório usado para o ensino. O tamanho da amostra para avaliação das variáveis independentes também pode ter contribuído para essa discrepância de resultados. Para o modelo logístico, considerando-se as variáveis independentes utilizadas, o poder foi relativamente baixo (menor que 50% para a maior parte das variáveis). No entanto, para as

variáveis significativas obteve-se poder moderado de 67% para número de parceiros e 68% no caso de paridade. O tamanho da amostra requerida para obter poder de 80%, com 95% de confiança, foi calculado em 442 pacientes. Esse número, entretanto, foi possível de se alcançar devido às dificuldades no encaminhamento pelos ginecologistas e ao tempo estabelecido para a conclusão do mestrado. Vale enfatizar, entretanto, que a amostra foi considerada suficiente para a análise geral da infecção por HPV.

Sabe-se que uma área do epitélio anogenital infectada pelo HPV facilita a dispersão do vírus para as áreas adjacentes (SCHOLEFIELD *et al.*, 1994). Diante disso, considerou-se pertinente a realização da pesquisa em número adequado de pacientes, no sentido de possibilitar resposta concreta sobre o tema. Inicialmente, pensou-se que seria rápida e fácil a realização de exame proctológico em muitas pacientes, sabendo-se que a incidência de HPV genital é elevada. Essa conduta, porém, ainda não faz parte da rotina e, às vezes, há questionamento do ginecologista sobre a necessidade do referido exame, quando a paciente não tem queixas ou sinais de doenças proctológicas. Em imunodeficientes já está comprovada essa necessidade, mas em pacientes sem história de imunodeficiência ainda há carência de dados para o estabelecimento dessa conduta. Foi realizado um trabalho de convencimento entre vários ginecologistas e serviços públicos de ginecologia e, mesmo assim, houve dificuldades em se conseguir número adequado de pacientes para esta pesquisa.

O tipo mais comum do câncer de ânus, o carcinoma de células escamosas, surge de áreas de neoplasias intra-epiteliais de alto grau em canal anal, como consequência de infecção crônica pelo papilomavírus humano e parece ter relação com alta carga do vírus na infecção (FOX, 2006). Mulheres com história de neoplasia em colo uterino são consideradas epidemiologicamente em risco de desenvolver câncer de ânus (PALESFSKY; SHIBOSKI; MOSS, 1994; TACHEZY *et al.*, 2007). Diante do resultado significativo obtido a respeito da prevalência de HPV em ânus nessas pacientes, do novo conceito de doença sexualmente transmissível para o câncer anal e da pouca ênfase dada ao exame proctológico pelos responsáveis pelas pacientes com HPV ginecológico, acredita-se serem necessárias campanhas para mais conscientização de ginecologistas, gestores de saúde pública e privada e proctologistas, para a prevenção das neoplasias anais.

Várias questões ainda estão sem resposta, tais como: quais outros fatores poderiam influenciar a infecção; a evolução das mulheres nas quais foi diagnosticado o HPV em ânus; persistência ou não da detecção viral através da PCR; qual seria a evolução da doença anal e incidência de neoplasias nestas pacientes; se a predominância de casos de

NIC I poderia ter influenciado a falta de lesões anais por causa de subtipos virais; se o fato de que em quase 100% das pacientes não terem sido identificadas lesões pela magnificação de imagens em canal anal teria sido influenciado pela inexperiência com o método. Outra questão em aberto é sobre os casos em que os subtipos virais ficaram sem identificação por serem diferentes dos subtipos pesquisados (19 em ânus e 21 em colo uterino). Haveria concordância entre os subtipos virais neles? Dessa forma, ao ser encontrado valor significativo da coexistência de HPV em ânus nas mulheres com doença ginecológica HPV induzida e diante destes questionamentos ainda sem resposta, abre-se uma linha de pesquisa necessária para padronizar-se o rastreamento dessas infecções com o objetivo de prevenir-se o câncer de ânus.

Com o recente desenvolvimento das vacinas contra o HPV, surge uma perspectiva para a possibilidade de erradicação dos cânceres anogenitais induzidos por esse vírus (STANLEY, 2007; VAN DOORN; KLETER; QUINT, 2001). Essa realidade, todavia, ainda carece de mais pesquisas, pois apenas quatro subtipos de HPV são empregados na vacina, 6, 11, 16 e 18. Além disso, faz-se necessário mais tempo de seguimento da população que começou a ser vacinada, para avaliação da real eficácia da mesma e o custo-benefício da prevenção.

7 CONCLUSÕES

Da análise dos dados deste estudo concluiu-se que:

- As mulheres com NIC têm mais probabilidade de serem acometidas por HPV anal.
- Não há concordância unânime entre os subtipos do HPV do colo do útero e do ânus.
- A paridade e o número de parceiros contribuem para aumentar a incidência de HPV anal nas mulheres sem imunodeficiência e com HPV cervical.

REFERÊNCIAS

- BIØRGE, T. *et al.* Human papillomavirus infection as a risk factor for anal and perianal skin cancer in a prospective study. **Brit J Cancer**, v.87: p.61-4, 2002.
- BONATTI, H. *et al.* Local administration of cidofovir for human papilloma virus associated skin lesions in transplant recipients. **Transp Int**, v.20, n.3: p.238-46, Mar 2007.
- BOSTJAN, M. Letters to the editor: Sigrid Regauer HPV, cervical dysplasia... 2006.
- MLAKAR, B. Anoscopy could be beneficial for women with external anogenital condyloma, *Eur. J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.133, n.1: p.121-2, 2007. Response: O'MAHONY, C. Anoscopy could be beneficial.... *Eur. J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.134, n.1: p.137, author reply 138-40, 2007 - **Letters to the editor**.
- BURCHELL, A.N. *et al.* Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. **Vaccine**, v.21, n.24 Suppl 3: p.S52-61, Aug 2006.
- CABRERA, A. *et al.* Development of lower genital carcinomas in patients with anal carcinoma: A more than casual relationship. **Cancer**, v.4: p.470-479, 1966.
- CALORE, E.E. *et al.* Expression of Ki-67 can assist in predicting recurrences of low-grade anal intraepithelial neoplasia in AIDS. **Dis Colon Rectum**, v.44: p.534-537, 2001.
- CHANG, G.J. *et al.* Surgical treatment of high-grade anal squamous intraepithelial lesions. **Dis Colon Rectum**, v.45, n.4: p.453-459, 2002.
- CHESSON, H.W. *et al.* Cost-effectiveness of human papillomavirus vaccination in the United States. **Emerg Infect Dis**, v.14, n.2: p.244-51, Feb 2008.
- COX, J.T. Human papillomavirus testing in primary cervical screening and abnormal Papanicolaou management. **Obstet Gynecol Surv**, v.61(6 Suppl 1): p.S15-25, Jun 2006.
- DALING, R.J. *et al.* Sexual practices, sexually transmitted diseases, and the incidence of, anal cancer. **N Engl J Méd**, v.317: p.973-7, 1987.
- DO CARMO, E.F.S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavírus humano. **Sábios - Rev Saúde e Biol**, Campo Mourão, v.2, n.1: p.29-31, Jan/Jun 2007.
- FEY, M.C.; BEAL, M.W.J. Role of human papillomavirus testing in cervical cancer prevention. **Midwifery Womens Healty**, v.49, n.1: p.4-13, Jan-Fev 2004.
- FOX, P.A. *et al.* The value of anal cytology and human papillomavirus typing in the detection of anal intraepithelial neoplasia: a review of cases from an anoscopy clinic. **Sex Transm Infect**, v.81, n.2: p.142-6, Apr 2005.
- FOX, P.A. Human papillomavirus and anal intraepitheial neoplasia. **Curr Opin Infect Dis**, v.19, n.1: p.62-6, Feb 2006.

FRANÇA, J.L. *et al.* **Manual para normalização de publicações técnico-científicas.** Belo Horizonte: Ed. UFMG, 8.ed, 2007.

FU, X.L. *et al.* Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. **Cancer Res**, v.58, n.9: p.3839-3844, 1998.

GERD, E.; GROSS, R.B. **Infecção por papilomavírus humano.** Atlas Clínico de HPV. Atmed, 1997.

GERD, E.; GROSS, R.B. **Infecção por papilomavírus humano.** Atlas Clínico de HPV, Artmed, Porto Alegre, 1999.

GERVAZ, P. *et al.* Squamous cell carcinoma of the anus: another sexually transmitted disease. **Swiss Med Wkly**, v.133: p.353-9, 2003.

GOLDIE, S.J. *et al.* The clinical effectiveness and cost-effectiveness of screening for anal squamous intraepithelial lesions in homosexual and bisexual HIV-positive men. **JAMA**, v.281: p.1822-1829, 1999.

GONÇALVES, M.A.G. *et al.* HPV type infection in different anogenital sites among HIV-positive Brazilian women. **Infect Agents Cancer**, v.14, n.3: p.5, Mar 2008.

HAYANGA, A.J. When to test women for human papillomavirus: taken this opportunity to screen for anal cancer too. **BMJ**, v.28, n.332(7535): p.237, Jan 2006.

HERNANDEZ, B.Y.; MCDUFFIE, K. Anal human papillomavirus infection in women and its relationship with cervical infection cancer. **Epidemiol Biomarkers Prev**, v.14, (11pt1): p.2550-6, Nov 2005.

HESELMAYER, K. *et al.* A recurrent pattern of chromosomal aberrations and immunophenotypic appearance defines anal squamous cell carcinomas. **J Cancer**, v.76, n.10: p.271-1278, 1997.

HUBBARD, RA. HPV testing methods. **Arch Pathol Lab Med**, v.127: p.940-945, 2003.
JAY, N. *et al.* Colposcopic appearance of anal squamous intraepithelial lesions. **Dis Colon Rectum**, v.40, n.8: p.919-927, 1997.

KREUTER, A. *et al.* Imiquimod leads to a decrease of human papillomavirus DNA and to a sustained clearance of anal intraepithelial neoplasia in HIV-infected men. **J Invest Dermatol**, (Epub ahead of print), Feb 2008.

LIE, A.K. *et al.* Can human papillomavirus testing and vaccination prevent cervical cancer? **Tidsskr Nor Laegeforen**, v.20, n.121(25): p.2947-51, Oct 2001.

LINHARES, A.C.; VILLA, L.L. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). **J Pediatr**, v.82: p.S25-24, 2000.

LÖRINCZ, A.T.; RICHART, R.M. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. **Arch Pathol Lab Med**, v.127, n.8: p.959-68, Aug 2003.

LÖRINCZ, A.T. Screening for cervical cancer: new alternatives and research. **Salud Publica Mex**, v.45 Suppl 3: p.S76-87, 2003.

LU, D.W.; EL-MOFTY, S.K.; WANG, H.L. Expression of P16, Rb, and p53 proteins cell carcinomas of the anorectal region harboring human papillomavirus DNA. **Mod Pathol**, v.16: p.692-699, 2003.

MAGI, J.C. *et al.* Anuscopia com exarcebação para diagnóstico de papilomavírus humano ano-retal na forma subclínica. **Rev Bras Coloproct**, v.22, n.3: p.178-183, 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. **Rev Assoc Med Bras**, v.50, n.3: p.282-5, 2004.

MARKOS, A.R. The presentation of anogenital cancers as sexually transmissible infection: a case for vigilance. **Sex Health**, v.4, n.1: p.79-80, Mar 2007.

MASSAD, L. *et al.* Women's Interagency HIV Study Group. Prevalence and predictors of squamous cell abnormalities in Papanicolaou smears from women infected with HIV-1. **JAIDS - Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v.21, n.1, May 1999.

MC CLOSKEY, J.C.; METCALF, C. **Int J STD AIDS**, v.18, n.8: p.538-42, Aug 2007.

MELBYE, M.; SPRØBEL, P. Aetiological parallel between anal cancer and cervical cancer. **Lancet**, v.338: p.657-9, 1991.

MONK, J.B.; TEWARI, K.S. The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection. **Gynecologic Oncology**, v.107 (2Suppl1); S6-S13, Nov. 2007.

MORGAN, G.A.; GRIECO O.V. **Easy and use interpretation of SPSS for Windows: Answering Research Questions With Statistics**. New Jersey. Lawrence Erlbaum Associates, Inc. Publishers 1998.

MOSCICKI, A.B. *et al.* Risk factors for abnormal anal cytology in young heterosexual women. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.8, n.2: p.173-8, Feb 1999.

NADAL, S.R. *et al.* Anal cytology for screening of pré-neoplastic lesions. **Rev Assoc Med Bras**, v.53, n.2: p.147-51, Mar Apr 2007.

NADAL, S.R. *et al.* Sistematização do atendimento dos portadores de infecção perianal pelo Papilomavírus Humano (HPV). **Rev Bras Coloproct**, v.24, n.4: p.322-328, 2004.

NADAL, S.R.; MANZIONE, C.R. Os agentes sexualmente transmissíveis e o câncer anorretal. **Rev Bras Coloproct**, v.24, n.3: p.274-277, 2004.

NATHAN, M. Treatment of anal human papillomavirus-associated disease: a long term outcome study. **Int J STD AIDS**, v.19, n.7: p.445-9, Jul 2008.

PALEFSKY, J.M.; SHIBOSKI, S.; MOSS, A. Risk factors for anal human papillomavirus infection and anal cytologic abnormalities in HIV-positive and HIV-negative homosexual men. **Acquir Immune Defic Syndr**, v.7, n.6: p.599-606, 1994.

PALEFSKY, M.J. *et al.* Anal cytology as a screening tool for anal squamous intraepithelial lesions. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v.15, n.14(5): p.415-22, Apr 1997.

PALMER, J.G. *et al.* Anal cancer and Human Papillomaviruses. **Dis Colon Rectum**, v.32, n.12: p.1016-22, Dec 1989.

PALMER, J.G. *et al.* Human papillomavirus type 16dna in anal squamous cell carcinoma. **Lancet**, v.II, p.42, 1987.

PESTANA, M.H.; GAGUEIRO, J.N. **Análise de dados para Ciências Sociais: complementaridade do SPSS**. 2.ed, Ed. Lisboa, 2000.

PINTO, A.P.; COLLAÇO, L.M. Revisão das alterações citomorfológicas da infecção pelo vírus do papiloma humano em citologia cervicovaginal. **J Bras Patol**, v.37, n.1: p.57-61, 2001.

RAMANUJAM, P.S. *et al.* Study of human papillomavirus infection in patients with anal squamous carcinoma. **Dis colon rectum**, v.39: p.137-43, 1996.

ROKA, F. *et al.* Anal human papillomavirus testing with Digene's hybrid capture 2 using two different sampling methods. **Dis Colon Rectum**, v.51, n.1: p.62-6, Jan 2008.

RYUZABURO, K.; TETSUYA, Y.; REIKO, F. Histological features of human papilloma virus 16 and its association with the development and progression of anal squamous cell carcinoma. **Surg Today**, v.36: p.885-891, 2006.

SCHOLEFIELD, J.H. *et al.* Anal and cervical intraepithelial neoplasia: possible parallel. **The Lancet**, v.30, n.9: p.765-8, 1989.

SCHOLEFIELD, J.H. *et al.* Anal colposcopy and the diagnosis of anal intraepithelial neoplasia in high-risk gynecologic patients. **Int. J Gynecol Cancer**, v.4: p.119-26, 1994.

SHEPHERD, N.A. *et al.* Anal cancer and human papillomavirus. **Dis Col Rect**, v.32, n.12: p.1016-1022, Dec 1989.

SOARES, J.; SIQUEIRA, A.L. **Introdução à Estatística Médica**. 1.ed. Belo Horizonte: Departamento de Estatística- UFMG, 1999.

SOBHANI, I. *et al.* Prevalence of high-grade dysplasia and câncer in the anal canal in human papillomavirus-infected individuals. **Gastroenterology**, v.120: p.857-866, 2001.

SOBIT, R.C. *et al.* Detection of human papillomavirus DNA, serum p53, and p 53 antibodies in patients with cervical cancer. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v.21, n.1: p.79-85, 2002.

STANLEY, M. Prophylactic HPV vaccines: prospects for eliminating ano-genital câncer. **Br J Cancer**, v.7, n.96: p.1320-3, May 2007.

STIER, E.A. *et al.* Infrared coagulator treatment of high-grade anal dysplasia in HIV-infected individuals: na AIDS malignancy consortium pilot study. **J Acquir Immune Defic Synd**, v.1, n.47(1): p.56-61, Jan 2008.

TABACHINIK, B.G.; FIDELL, L.S. **Using Multivariate Statistics**. 3.ed. New York: Harper Collins, 2001.

TACHEZY, R. *et al.* Human papillomavirus infection and tumours of the anal canal: correlation of histology, PCR detection in paraffin sections and serology. **APMIS**, v.115, n.3: p.195-203, Mar 2007.

TAVARES S.B.N. *et al.* Controle da qualidade em citologia cervical: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53,n.3:p.355-364, 2007.

TROTTIER, H.; FRANCO, E.L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine**, v.30, n.24 Suppl 1: p.S1-15, Mar 2006.

URONIS, H.E.; BENDELL, J.C. *Oncologist*. V.12, n.5: p.524-34, May 2007.

VAN DOORN, L.J.; KLETER, B.; QUINT, W.G.V. Molecular detection and genotyping of Human Papillomavirus. **Expert Rev Mol Diagn**, v.1: p.394-402, 2001.

VARNAI, A.D. *et al.* HPV in a anal squamous cell carcinoma and anal intraepithelial neoplasia (AIN). **Int J Colorectal Dis**, v.21: p.135-142, 2006.

VÉO, C.A.R. *et al.* Study on prevalence of human papillomavirus in the anal canal of women with cervical intraepithelial neoplasia gradeIII. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.140, n.1: p.103-7, Sep 2008.

WHO. World Health Organization. **Classification of tumours pathology and genetics of tumours of digestive system**. Lyon: IARC Press, 2000.

WRIGHT JR., T.C.; RALPH, M.; RICHART, M.D. Role of human papillomavirus in the pathogeneses of genital tract warts and cancer. **Gynecol Oncology**, v.37: p.151-164, 1990.

APÊNDICES E ANEXO

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Anuscopia com Magnificação de Imagem em Pacientes Portadoras de Infecção Genital por Papilomavírus Humano”. Você foi selecionada por ser portadora de HPV genital sem queixas anais e devido ao fato de a literatura médica mostrar que há possibilidades de haver contaminação das regiões próximas, como o ânus. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará qualquer prejuízo à sua relação com o pesquisador ou a instituição.

Os objetivos deste estudo são demonstrar se realmente existe necessidade de exame proctológico em pacientes com HPV genital sem queixas anais ou perianais. Utilizaremos aparelho que aumenta as imagens vistas no exame, que é o mesmo usado na ginecologia, o colposcópio, para melhor identificação das possíveis lesões.

Sua participação nesta pesquisa consistirá de submeter-se ao exame proctológico. Os riscos relacionados à sua participação são os mesmos de um exame proctológico de rotina, ou seja, praticamente nenhum.

Os benefícios obtidos com sua participação são os de criarmos parâmetros para podermos afirmar se o exame proctológico, em casos como o seu, é necessário ou não, sendo o objetivo final prevenir um possível câncer de ânus, tal como é feito em Ginecologia. A sua identidade será resguardada.

As informações obtidas por meio desta pesquisa serão publicadas e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados serão divulgados de forma a impossibilitar sua identificação e todos os resultados dos exames a que for submetida serão guardados em seu prontuário médico, sigilosamente.

Você receberá uma cópia deste termo, no qual constam telefone, endereço e CEP do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação agora ou a qualquer momento.

Nome e assinatura do pesquisador

Pesquisador principal: Dra. Alice Capobiango

31- 3262 0345 ou 3299 9011

CEP: 31 – 3299 9002

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação e concordo, voluntariamente, em participar.

Nome e assinatura do Sujeito da Pesquisa

Belo Horizonte, / /

APÊNDICE B – Questionário pesquisa HPV anal

Nº da paciente:

Data: / /

Nome: _____

Idade:

cor: M () L () F ()

Hospital: () Clínicas () Mário Pena Registro: _____

Início vida sexual: _____ anos

Nº parceiros: último ano:

coito anal: () sim () não manipulação anal: () sim () não

Paridade: _____

Uso contraceptivo hormonal: () sim () não

Reposição hormonal: () sim () não

Imunossupressores: corticóide:

Tabagismo: () sim () não

Doença ginecológica: () NIC I () NIC II () NIC III

Alterações perianais: () não () sim _____

Alterações anais: () não () sim _____

Resultado PCR:

ânus: () positivo () subtipo () não identificado

() negativo

colo do útero: () positivo () subtipo () não identificado

() negativo

ANEXO A -