

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS

KATIANE APARECIDA VILELA DE REZENDE

**ANÁLISE MOLECULAR DO DNA-HPV-16 E HPV-6/11 EM
AMOSTRAS DE CONDILOMA ACUMINADO E CARCINOMA
PENIANOS**

Belo Horizonte
2019

KATIANE APARECIDA VILELA DE REZENDE

**ANÁLISE MOLECULAR DO DNA-HPV-16 E HPV-6/11 EM AMOSTRAS DE
CONDILOMA ACUMINADO E CARCINOMA PENIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Gabrielle de Lima Rocha

Belo Horizonte
2019

R467a

Rezende, Katiane Aparecida Vilela de.

Análise molecular do DNA-HPV-16 e HPV-6/11 em amostras de condiloma acuminado e carcinoma penianos / Katiane Aparecida Vilela de Rezende. – 2019.

140 f.:il.

Orientador: Adriano de Paula Sabino.

Coorientadora: Maria Gabrielle de Lima Rocha.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Neoplasias Penianas – Teses. 2. Condiloma acuminado – Teses. 3. Carga viral – Teses. 4. Vírus do papiloma – Teses. 5. I. Sabino, Adriano de Paula. II. Rocha, Maria Gabrielle de Lima. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:616.994

Elaborado por Aline Guimarães Amorim – CRB-6/2292



FOLHA DE APROVAÇÃO

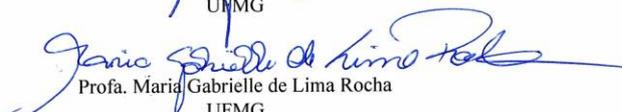
**ANÁLISE MOLECULAR DO DNA-HPV-16 E HPV-6/11 EM
AMOSTRAS DE CONDILOMA ACUMINADO E CARCINOMA
PENIANOS**

KATIANE APARECIDA VILELA DE REZENDE

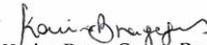
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 29 de março de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Adriano de Paula Sabino - Orientador
UFMG


Profa. Maria Gabrielle de Lima Rocha
UFMG


Profa. Helen Lima Del Puerto
UFMG


Profa. Karina Braga Gomes Borges
UFMG

Belo Horizonte, 29 de março de 2019.

Colaboradores

- Prof^a. Dra. Annamaria Ravara Vago – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
- Prof. Dr. Marcelo Antonio Pascoal Xavier – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais
- Dr. Paulo Guilherme de Oliveira Salles – Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Luxemburgo
- Dr. Alexandre Tafuri – Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri
- Dr^a. Erika Meinick Nascimento - Laboratório de Anatomia Patológica Citodiagnóstico
- Dr^a. Elvira Maria Bertges Fávero - Laboratório de Anatomia Patológica Citodiagnóstico

Dedico este trabalho ao meu pai, Antônio Carlos
e à minha sogra Regina Márcia
exemplos de trabalho, força e persistência.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me mostrar o caminho e me dar forças para percorrê-lo.

À minha mãe pelo apoio, amor e carinho. Aos meus irmãos e a toda minha família que sempre torceram por mim.

Ao meu esposo, Danilo, pelo companheirismo, por me dar forças para percorrer esse caminho, por não medir esforços para que eu chegasse até aqui e principalmente por todo amor.

Ao meu cunhado, Darlan, pelo incentivo e pela ajuda de sempre.

Aos meus orientadores Adriano e Maria Gabrielle, pela confiança, dedicação, paciência e pelos ensinamentos, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Annamaria Ravara Vago pelo carinho, atenção e pela valiosa contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Marcelo Antonio Pascoal Xavier pela disponibilidade, pelos ensinamentos e pela valiosa contribuição.

Aos colaboradores Dr. Paulo Guilherme de Oliveira Salles, Dr. Alexandre Tafuri, Dr^a. Erika Meinick Nascimento, Dr^a. Elvira Maria Bertges Fávero e toda a equipe dos Laboratórios de Anatomia Patológica que gentilmente nos cederam as amostras utilizadas neste estudo.

À professora Jaqueline Germano pela contribuição e pelo apoio oferecido.

À amiga Paula Vasconcelos pelos momentos compartilhados, dividindo os momentos de preocupação e também os de alegria.

Às alunas de iniciação científica Helen e Fernanda, obrigada pela enorme ajuda, sendo meu braço direito nas atividades do laboratório.

Aos professores e colegas do programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pelo auxílio e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Patogênese Molecular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Vitor Bruno Pereira Sousa e Larissa Rodrigues Peixoto, que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Aos colegas de trabalho do Hospital Alberto Cavalcanti pela amizade, por todo apoio, palavras de incentivo e pelas trocas de plantão que foram imprescindíveis para que conseguisse cumprir com todas as atividades da pós-graduação.

Muito obrigada!

RESUMO

O câncer peniano é representado por 2% dos casos de câncer associados ao Papilomavírus humano (HPV). Seu diagnóstico costuma ser tardio, levando a tratamentos caros e agressivos, à mutilação e até mesmo amputação do membro. O HPV também está associado a uma lesão proliferativa benigna denominada de condiloma acuminado, que tem alta morbidade. Existem fortes evidências de que pacientes com condiloma acuminado apresentam maior chance de desenvolver tumores malignos quando comparados aos pacientes sem essa lesão. Por isso, este estudo pretendeu avaliar a presença e a genotipagem do HPV por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em 23 amostras de câncer peniano e 86 de condiloma acuminado, além de verificar a carga viral do HPV-6/11 e HPV-16 e o estado físico do HPV-16 por PCR em tempo real. A prevalência da infecção por HPV foi de 52% nas amostras de carcinoma e 80% nas amostras de condiloma. Múltiplas infecções com vírus de alto e baixo risco carcinogênico foram encontradas em 12% das amostras, sendo algo frequente em lesões benignas. Foi encontrada ampla variação de carga viral tanto do HPV-6/11, quanto do HPV-16. Pode-se observar a presença frequente de altas cargas virais em lesões mais graves, entretanto a grande variação encontrada pode dificultar a utilização da carga viral como marcador no diagnóstico precoce do câncer peniano. A maioria das amostras de condiloma acuminado infectadas pelo HPV-16 apresentou algum grau de integração (75%), assim como todas as amostras de carcinoma peniano, sugerindo que a integração é um fenômeno frequente e que pode constituir um fator importante para a carcinogênese, mas não único.

Palavras-chave: Câncer peniano. Condiloma acuminado. Carga viral. Estado físico DNA-HPV.

ABSTRACT

Penile cancer is represented by 2% of the cases of cancer associated with Human Papillomavirus (HPV). Their diagnosis is usually late, leading to expensive and aggressive treatments, mutilation and even limb amputation. HPV is also associated with a benign proliferative lesion called condyloma acuminata, which has high morbidity. There is strong evidence that patients with condylomata acuminata are more likely to develop malignant tumors when compared to patients without condyloma. Therefore, this study aimed to evaluate the presence and genotyping of HPV by Polymerase Chain Reaction (PCR), in 23 penile cancer and 86 condylomata acuminata samples, as well as to verify HPV-6/11 and HPV viral load -16 and the physical state of HPV-16 by real-time PCR. The prevalence of HPV infection was 52% in the carcinoma samples and 80% in the condyloma samples. Multiple infections with high and low risk carcinogenic viruses were found in 12% of the samples, being frequent in benign lesions. A wide range of viral load was found for both HPV-6/11 and HPV-16. It can be observed the frequent presence of high viral loads in more serious lesions, however the great variation found may hinder the use of viral load as a marker in the early diagnosis of penile cancer. Most HPV-16 infected condyloma acuminata samples showed some degree of integration (75%), as well as all samples of penile carcinoma, suggesting that integration is a frequent phenomenon and may be an important factor for carcinogenesis, but not unique.

Keywords: Penile cancer. Condylomata acuminata. Viral load. Physical state of DNA-HPV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Árvore filogenética do HPV.....	19
Figura 2 – Estrutura do genoma do HPV-16 e as proteínas virais.....	20
Figura 3 – Infecção pelo HPV no colo do útero, diferenciação dos queratinócitos e expressão das proteínas virais.....	23
Figura 4 – Instabilidade genômica da célula hospedeira induzida pela maquinaria de replicação do HPV.....	25
Figura 5 – Representação histológica do Condiloma Acuminado.....	27
Figura 6 – Representação histológica das Neoplasias Intraepiteliais Penianas.....	33
Figura 7 – Representação histológica de carcinomas epidermóides do pênis.....	38
Figura 8 – Representação das ampliações das amostras testadas através da PCR em tempo real.....	76
Figura 9 – Curvas padrão dos plasmídeos pHPV-6 e p- HPV11.....	77
Figura 10 – Curvas de amplificação das reações de PCR em tempo real padronizadas e utilizadas durante este estudo.....	80
Figura 11 – Curvas padrão das reações de PCR em tempo real padronizadas e utilizadas durante este estudo.....	81
Figura 12 – Curva melting das reações de PCR em tempo real padronizadas e utilizadas durante este estudo.....	82
Figura 13 – Fotografias representativas das amostras utilizadas neste estudo em seus diferentes diagnósticos histopatológicos.....	84
Figura 14 – Amostras de géis de poliacrilamida corados pelo nitrato de prata, apresentando resultados de diferentes de acordo com a PCR realizada.....	85
Figura 15 – Carga viral do HPV-6/11 em amostras de Papiloma, Verruga e Condiloma.....	87
Figura 16 – Carga viral do HPV-6/11 em amostras de Condiloma e Câncer.....	88
Figura 17 – Carga viral do HPV-16 em amostras de Condiloma e Câncer.....	91
Figura 18 – Carga viral do HPV-16 em amostras de Condiloma e Câncer.....	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resumo das características clínicas e histopatológicas do Condiloma Acuminado, Verruga e Papiloma anogenitais.....	28
Quadro 2 – Componentes da reação de PCR para amplificação do gene β -globina (268 pb).....	62
Quadro 3 – Componentes da reação de PCR para amplificação do gene β -globina (110 pb).....	62
Quadro 4 – Programa de amplificação do gene β -globina (268 e 110 pb).....	63
Quadro 5 – Componentes da reação de PCR para amplificação de um fragmento de 450 pb do genoma viral.....	63
Quadro 6 – Programa de amplificação do fragmento de 450 pb do genoma viral.....	64
Quadro 7 – Componentes da reação de PCR para amplificação de um fragmento de 150 pb do genoma viral.....	64
Quadro 8 – Programa de amplificação do fragmento de 150 pb do genoma viral.....	65
Quadro 9 – Componentes da reação de PCR para amplificação de um fragmento que varia de 306 a 343 pb do genoma viral.....	66
Quadro 10 – Componentes da reação de PCR para amplificação de um fragmento de 149 pb do genoma viral.....	66
Quadro 11 – Programa de amplificação dos fragmentos virais representados nos Quadros 9 e 10.....	67
Quadro 12 – Componentes da reação de PCR para amplificação de um fragmento de 301 pb.....	67
Quadro 13 – Programa de amplificação do fragmento de 301 pb do genoma viral.....	68
Quadro 14 – Iniciadores utilizados na determinação da carga viral do HPV-16.....	70
Quadro 15 – Iniciadores testados na padronização da PCR em tempo real para determinação da carga viral do HPV-6 e 11.....	72
Quadro 16 – Iniciadores utilizados na determinação do estado físico do HPV-16, região alvo gene E2.....	73
Quadro 17 – Reagentes utilizados no preparo de 20 μ L de reação de PCR.....	78
Quadro 18 – Etapas dos programas de amplificação das reações de PCR.....	79

Quadro 19 – Relação de amostras de condiloma acuminado e câncer peniano utilizadas neste estudo e seus respectivos diagnósticos histopatológicos.....83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amostras preparadas e utilizadas na categorização da relação E2/E6 e valores dessa relação determinados experimentalmente.....	74
Tabela 2 – Resultado da quantificação de DNA das amostras extraídas.....	77
Tabela 3 – Prevalência da infecção por HPV nas 109 amostras analisadas.....	86
Tabela 4 – Valores de carga viral do HPV-6/11 (vírus/célula) nas amostras analisadas e sua variação em relação ao diagnóstico histopatológico e em presença de múltiplas infecções.....	89
Tabela 5 – Valores de carga viral do HPV-16 (vírus/célula) nas amostras analisadas e sua variação em relação ao diagnóstico histopatológico e em presença de múltiplas infecções.....	92
Tabela 6 – Estado físico do DNA-HPV-16 de acordo com a análise histopatológica das amostras.....	93
Tabela 7 – Estado físico DNA-HPV-16 e valores de carga viral (vírus/célula).....	94
Tabela 8 – Estado físico do DNA-HPV-16 em relação ao diagnóstico histopatológico e respectiva carga viral.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	5-fluorouracil
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CT	Cycle Threshold, tradução (Limiar do Ciclo)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , tradução (ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates, tradução (Desoxinucleótido Trifosfato)
E	<i>Early</i> , tradução (gene precoce)
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> , tradução (Fator de crescimento epidérmico)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> , tradução (Receptor do fator de crescimento epidérmico)
EUA	<i>Estados Unidos da América</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , tradução (Administração de Alimentos e Medicamentos)
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FoSTeS	<i>Fork Stalling and Template Switching</i> , tradução (Estolagem de forquilha e troca de modelos)
HAT	<i>Histone acetyltransferase</i> , tradução (Histona acetiltransferase)
HDAC	<i>Histone deacetylase</i> , tradução (Histona desacetilase)
HE	Hematoxilina e Eosina
HIV	Human Immunodeficiency Virus, tradução (vírus da imunodeficiência humana)
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	<i>Low-grade squamous intraepithelial lesion</i> , tradução (Lesão intraepitelial cervical de alto grau)
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IQ	Intervalo Interquartil
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
JEC	Junção escamo-colunar
L	<i>Late</i> , tradução (gene tardio)
LB	Luria-Bertani
LCR	<i>Long control region</i> , tradução (Região de controle longa)

LSIL	<i>Low-grade squamous intraepithelial lesion</i> , tradução (Lesão intraepitelial cervical de baixo grau)
MMBIR	<i>Microhomology-Mediated Break-Induced Replication</i> , tradução (Replicação induzida por quebra mediada por microhomologia)
n	Número amostral
NIA	Neoplasia Intraepitelial Anal
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i> , tradução (Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas)
NIP	Neoplasia Intraepitelial Peniana
ORF	<i>open reading frame</i> , tradução (janela de leitura)
pb	pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction, tradução (Reação em Cadeia de Polimerase)
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i> , tradução (Fator de crescimento derivado de plaquetas)
pRB	Proteína do retinoblastoma
RNAm	messenger Ribonucleic acid, tradução (Ácido ribonucleico mensageiro)
SINE	<i>Sort Interspersed Elements</i> , tradução (ordenação de elementos intercalados)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
URR	<i>Upstream regulatory region</i> , tradução (região reguladora a montante)
vs	versus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 O HPV	18
2.1.1 Ciclo biológico do HPV	22
2.2 Doenças causadas pelo HPV na população masculina	26
2.2.1 Condiloma acuminado	26
2.2.2 Neoplasias intraepiteliais	32
2.2.3 Câncer	35
2.3 Carcinogênese viral	40
2.3.1 Múltiplas infecções	41
2.3.2 Carga viral.....	43
2.3.3 Estado físico do DNA-HPV	48
2.4 Diagnóstico da infecção por HPV e de sua neoplasia associada	54
3 JUSTIFICATIVA.....	56
4 OBJETIVOS.....	57
4.1 Objetivo Geral.....	57
4.2 Objetivos Específicos	57
5 METODOLOGIA	58
5.1 População Estudada	58
5.2 Análise Histopatológica.....	58
5.3 Análise molecular.....	58
5.3.1 Desparafinização da amostra e extração de ácidos nucleicos	58
5.3.2 Amplificação do gene de β-globina, identificação da infecção por HPV e tipagem.....	60
5.3.2.1 Amplificação do gene β-globina	62
5.3.2.2 Determinação da infecção por HPV.....	63
5.3.2.3 Tipagem do HPV-16.....	65
5.3.2.4 Tipagem do HPV-6/11.....	67
5.3.3 Determinação da carga viral dos vírus HPV-6/11 e HPV-16, e estado físico do DNA-HPV-16	68
5.3.3.1 Plasmídeos pE6, pHPV-16, pHPV-11, pHPV-6 e célula SiHa.....	68
5.3.3.2 Determinação da carga viral do HPV-16.....	70

5.3.3.3 Determinação da carga viral dos HPVs-6/11	71
5.3.3.4 Determinação do estado físico do DNA-HPV-16 (razão E2/E6)	72
5.4 Análise estatística	74
6 RESULTADOS	76
6.1 Padronização dos métodos de extração do DNA	76
6.2 Padronização dos métodos de PCR em Tempo Real	77
6.3 Análise histopatológica	83
6.4 Prevalência da infecção por HPV	85
6.5 Carga viral	86
6.5.1 Determinação da carga viral do HPV-6/11	86
6.5.2 Determinação da carga viral HPV-16	90
6.6 Estado físico do DNA-HPV-16	93
7 DISCUSSÃO	97
8 CONCLUSÕES	108
9 PERSPECTIVAS DO ESTUDO	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
ANEXO A - CARTA CONVITE PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PESQUISA	136
ANEXO B - CARTA DE ACEITE PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PESQUISA	138
ANEXO C – Carta de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais	139

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

A infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) é uma das infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) mais comuns em todo o mundo. Considerados como um dos mais potentes carcinógenos humanos, os HPVs de alto risco oncogênico são responsáveis, anualmente, por aproximadamente 630 mil casos de câncer em todo o mundo (4,5% de todos os casos) (DE MARTEL *et al.* 2017; PLUMMER *et al.*, 2016). Estes vírus são responsáveis pela ocorrência de todos os casos de cânceres cervicais, 88% dos cânceres anais, 24,9% dos cânceres vulvar, 78% dos cânceres de vagina, 30,8% dos cânceres orofaríngeos, 2,2% dos cânceres da cavidade oral, 2,4% do câncer de laringe e 50% dos cânceres de pênis (DE MARTEL *et al.*, 2017).

A grande maioria (83%) dos casos de câncer relacionados ao HPV são de câncer cervical, já o câncer peniano é representado por 2% dos casos (SERRANO *et al.*, 2018).

Apesar da incidência do câncer peniano ser baixa, seu estudo não pode ser considerado de menor importância, pois geralmente seu diagnóstico costuma ser tardio, levando a tratamentos caros e agressivos, à mutilação e até mesmo amputação do membro. Deve-se levar também em consideração o papel que o homem desempenha na transmissão do HPV às suas parceiras sexuais, atuando como reservatório do vírus.

Além dos HPVs de alto risco, existem também os HPVs de baixo risco oncogênico, que apresentam menor relevância clínica por estarem frequentemente associados a lesões mais simples, menos graves e de fácil resolução. Estes vírus de baixo risco podem causar neoplasias intraepiteliais de baixo grau, sendo rara sua evolução para lesões malignas, algo relatado em pacientes imunossuprimidos, e podem também se manifestar na forma de lesões exofíticas e benignas denominadas condilomas acuminados, vulgarmente conhecidas como verrugas genitais. O HPV-6 e o HPV-11 são os tipos virais mais prevalentes, sendo responsáveis por 90% dos casos de condilomas acuminados, lesão genital mais frequente na população masculina.

Apesar das lesões provocadas por HPVs de baixo risco serem consideradas pouco relevantes na progressão para o câncer, existem fortes evidências de que pacientes com condiloma acuminado apresentam maior chance de

desenvolver tumores malignos quando comparados aos pacientes sem essa lesão. Com base no conhecimento atual disponível, acredita-se que o aumento do risco nestes pacientes se deve à potencialização da ação carcinogênica dos HPVs de alto risco presentes em múltiplas infecções com HPVs de baixo risco, ou à presença de uma deficiência imunológica prévia, não sendo o risco aumentado uma consequência da ação direta destes tipos virais (BENNETTS *et al.*, 2015).

Portanto, seja por ação direta ou indireta (potencializando a ação carcinogênica dos HPVs de alto risco), a presença de HPVs de baixo risco pode estar relacionada à progressão ao câncer. Estudos que examinem os mecanismos biológicos subjacentes a estas observações, envolvendo pacientes com condiloma acuminado, com única ou múltiplas infecções e seu risco real de desenvolvimento de lesões neoplásicas se tornam necessários. Cabe ressaltar a necessidade de desenvolvimento de métodos de triagem e diagnóstico precoce para estes pacientes. Lesões neoplásicas penianas são pouco frequentes, seu diagnóstico é difícil e quando preciso e precoce possibilita uma rápida intervenção, garante tratamentos adequados e menos agressivos e dispendiosos, possibilitando também a estratificação do risco de evolução para câncer e o acompanhamento do paciente mais grave, além de reduzir gastos (VYAS *et al.*, 2015).

Estudos em mulheres associam fortemente a presença de altas cargas virais à persistência de infecção e ao desenvolvimento e agravamento de lesões, promovendo um aumento na frequência da integração viral (SCHMELER; STURGIS 2016; DONG *et al.*, 2018). Entretanto, não foram encontrados estudos que demonstrem como as múltiplas infecções podem influenciar na carga viral, na frequência de integração, na persistência da infecção e no agravamento de lesões em amostras penianas.

Destaca-se que este estudo pretende acrescentar informações a uma literatura escassa relacionada à detecção, genotipagem e determinação da carga viral e do estado físico do DNA do HPV em lesões penianas benignas e malignas. São poucos os trabalhos desenvolvidos na população masculina quando comparada à feminina, além de contribuir para um melhor entendimento sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de lesões neoplásicas em homens, e a influência das múltiplas infecções no aparecimento e progressão dessas lesões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O HPV

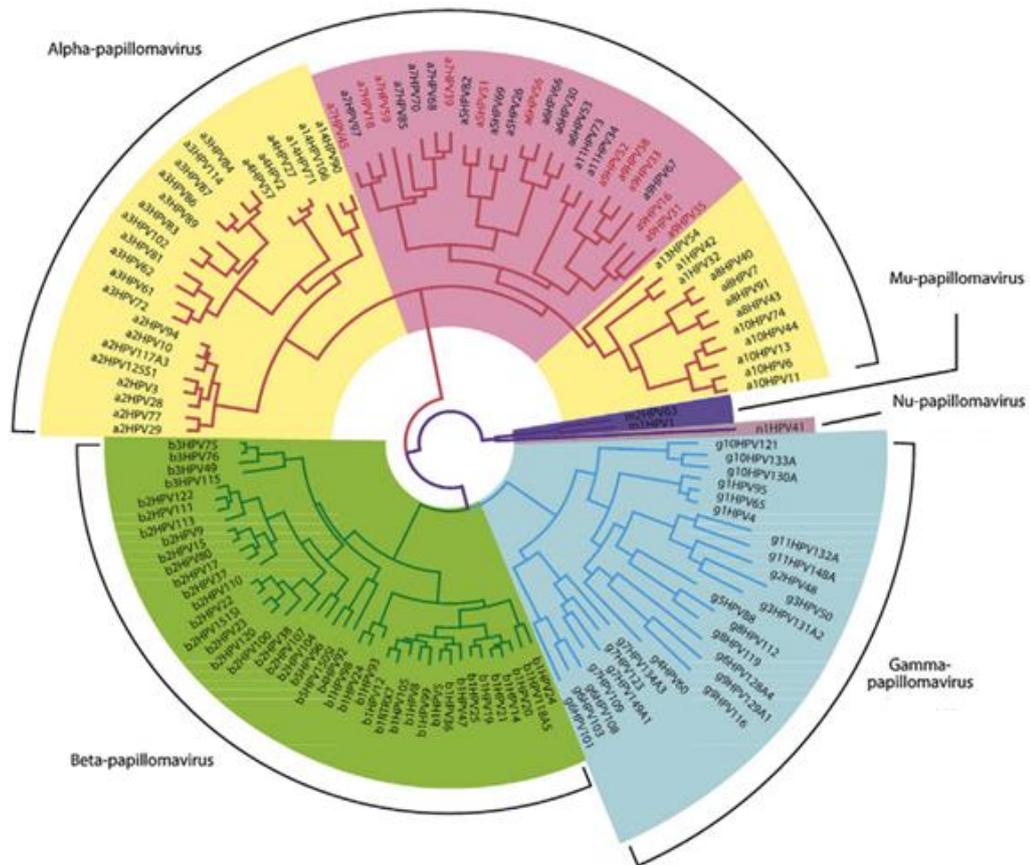
O vírus HPV promove infecções em pele e mucosas, sendo essas, em sua maioria, assintomáticas. No entanto, quando manifestações clínicas se fazem presentes, essas variam desde lesões benignas, como o condiloma acuminado, até lesões graves, como o câncer (CHOW *et al.*, 2010).

Este vírus pertence à família *Papillomaviridae*, um grupo heterogêneo, mas que compartilha a mesma estrutura e organização genômica (BRAVO; SANCHEZ, 2015). São classificados de acordo com o sequenciamento do seu gene estrutural *L1*, sendo definido um novo tipo quando esta sequência se difere, de pelo menos, 10% da sequência dos outros já classificados. Isolados de HPV do mesmo tipo que diferem de 10% em toda a sua sequência genômica são classificados em linhagens, sub-linhagens e variantes. Estas diferenças estão associadas ao poder carcinogênico viral (BURK; HARARI; CHEN, 2013; EGAWA; DOOBAR, 2017).

Até o momento cerca de 200 tipos de papilomavírus foram identificados e agrupados em diferentes gêneros (Alpha-, Nu-/Mu-, Beta- e Gamma-papillomavirus), de acordo com sua estrutura genômica e tropismo. Aproximadamente 40 tipos podem infectar a mucosa anogenital (de VILLIERS, 2013; EGAWA; DOOBAR, 2017; VAN DER WEELE; MEIJER; KING, 2017) (Figura 1). O gênero Alpha, inclui os genótipos que foram descritos como os principais causadores de câncer, enquanto as infecções pelos tipos virais pertencentes ao grupo Beta são geralmente assintomáticas, exceto em casos de imunossupressão, os quais podem aumentar a predisposição ao câncer (DOORBAR *et al.*, 2012).

Os HPVs também podem ser classificados como baixo risco oncogênico (fraca associação ao câncer) e alto risco oncogênico (forte associação ao câncer). De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), 12 tipos de HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59) foram classificados como carcinógenos em humanos (de SANJOSÉ; BROTONS; PAVÓN, 2018). O HPV-6 e o HPV-11 são os mais comuns considerados de baixo risco e geralmente são os causadores de lesões benignas, como as verrugas genitais (EGAWA; DOOBAR, 2017).

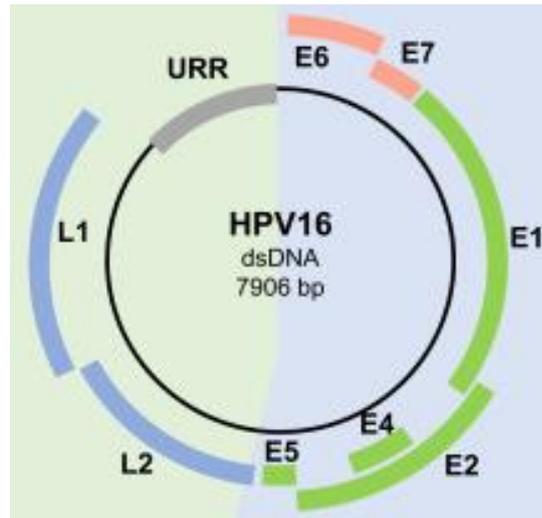
Figura 1 - Árvore filogenética do HPV



Os tipos de HPV encontrados em humanos se enquadram em cinco gêneros, com os vírus Alpha (amarelo e rosa), Beta (verde) e Gamma-papillomavirus (azul) representando os maiores grupos. Os HPVs do gênero Alpha-papillomavirus são frequentemente classificados como cutâneo de baixo risco e mucoso de baixo risco (amarelo); ou mucoso de alto risco (rosa) de acordo à sua associação com o desenvolvimento do câncer. Neste último grupo, os vírus em vermelho são comprovadamente cancerígenos e os demais classificados como "prováveis". Esta árvore filogenética é baseada no alinhamento dos genes *E1*, *E2*, *L1* e *L2* (Doorbar *et al.*, 2012).
 Fonte: adaptado de EGAWA; DOOBAR, 2017, p. 120.

O HPV é um vírus de DNA circular, dupla fita, não envelopado, medindo, aproximadamente 55 nanômetros de diâmetro. Seu genoma possui aproximadamente 8.000 pares de bases, que codificam todas as funções virais (CHOW *et al.*, 2010). Ele pode ser dividido em três regiões funcionais: a região *early* (*E*, precoce), que codifica genes transcritos precocemente, e que são necessários para a replicação do DNA viral (genes *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*); a região *late* (*L*, tardio), a qual codifica as proteínas do capsídio *L1* e *L2*; e a região denominada como *long control region* (*LCR*, região de controle longa), também denominada de *upstream regulatory region* (*URR*, região reguladora a montante), uma região não codificadora contendo a origem de replicação viral e sítios de ligação dos fatores de transcrição que regulam a expressão gênica do HPV (DOORBAR *et al.*, 2012) (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura do genoma do HPV-16 e as proteínas virais



Estrutura do genoma do HPV-16, as proteínas virais codificadas (E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1, L2) e a região reguladora (URR).

Fonte: adaptado de DE SANJOSÉ; BROTONS; PAVÓN, 2018, p. 4.

Os genes *E1* e *E2* são responsáveis pela replicação do DNA viral e controle da transcrição dos demais genes, estando envolvidos na proliferação viral. A proteína *E1* juntamente com a *E2* formam um complexo que se liga na região LCR, direcionando fatores de transcrição do hospedeiro e favorecendo a replicação viral. *E2*, por sua vez, participa da regulação da transcrição do DNA viral, ativando ou inibindo. *E1* e *E2* são essenciais para a estabilização do DNA viral e possuem papel importante na regulação da expressão das proteínas *E6* e *E7*, favorecendo a manutenção da forma episomal (KADAJA *et al.*, 2009).

O gene *E4* codifica uma proteína associada à maturação e à montagem viral. *E4* se associa com ceratinas do citoesqueleto da célula hospedeira, abrindo uma ampla cavitação em torno do núcleo conhecida morfologicamente como coilócito. A abertura deste espaço favorece a montagem dos vírions e é a marca microscópica da infecção por HPV (DOOBAR *et al.*, 2012).

A região de *E5* codifica uma proteína hidrofóbica, que se associa às membranas do complexo de Golgi, do retículo endoplasmático, tendo destino final a membrana citoplasmática das células do hospedeiro. A proteína *E5* é produzida logo no início da infecção, e atua estimulando o crescimento celular através de interações com várias outras proteínas transmembranas, como os receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR), do 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).

Para a sua replicação, o HPV precisa da DNA polimerase e dos fatores de transcrição, que são abundantemente produzidos pelas células do epitélio escamoso estratificado do hospedeiro durante a divisão celular. Esta produção é cessada à medida que as células escamosas começam a amadurecer e se diferenciar. Esse problema é resolvido pela atuação dos genes *E6* e *E7*, os quais codificam proteínas que podem viabilizar a manutenção da maquinaria de replicação celular, levando a erros durante a duplicação do DNA e cooperando para a imortalização celular (DOORBAR *et al.*, 2012; NGUYEN; MÜNGER, 2009; YUAN *et al.*, 2012).

As proteínas *E6* e *E7* são as condutoras do papel carcinogênico, através de vários mecanismos, principalmente a inibição dos supressores de tumores, como a proteína *p53* e da proteína do retinoblastoma (*pRb*) (DE SANJOSÉ; BROTONS; PAVÓN, 2018; PSYRRI; DIMAIO, 2008).

A *E7* promove a instabilidade genômica e o acúmulo de anormalidades cromossômicas. Essas atividades criam um ambiente propício para a transformação das células epiteliais. *E7* se liga à *pRb* em seu sítio de ligação a fatores de transcrição. Esta interação leva à liberação do fator de transcrição *E2F* do complexo repressor transcricional, desencadeando uma proliferação celular descontrolada e destruição de *pRb* via ubiquitinação (MCBRIDE; WARBURTON, 2017).

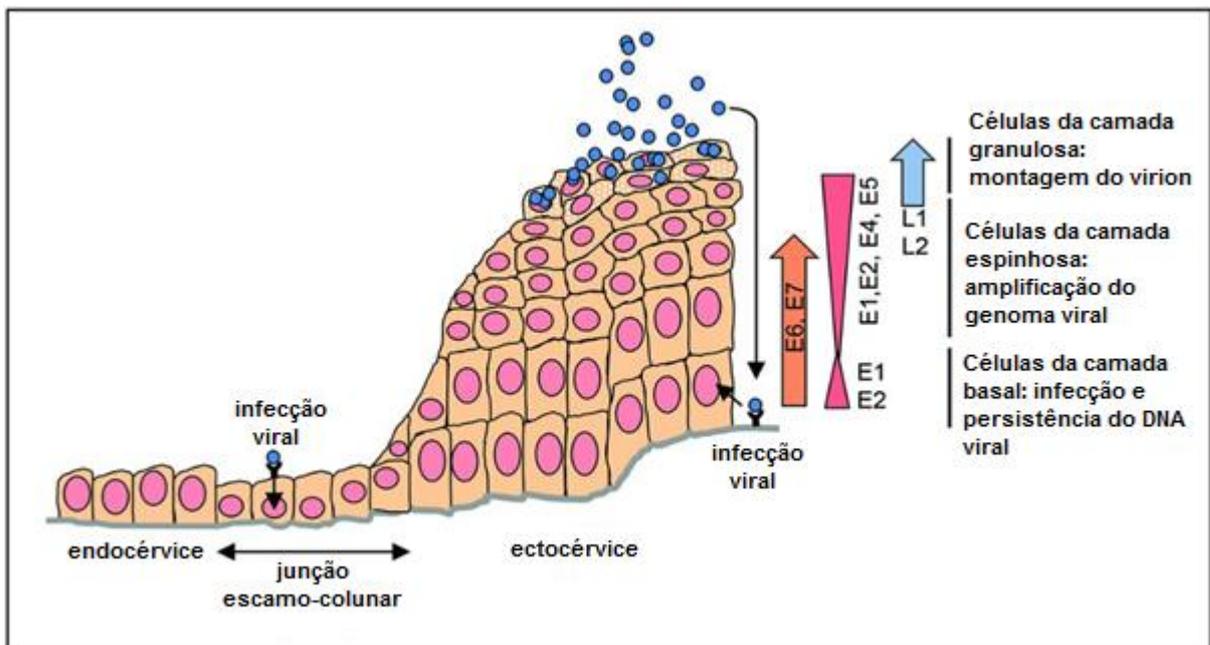
As funções de *E6* incluem ativação da telomerase e desregulação das vias envolvidas na resposta do sistema imune, da diferenciação epitelial e proliferação celular (MCBRIDE; WARBURTON, 2017). A proteína *E6* complementa o papel desempenhado por *E7*, evitando a indução de apoptose em resposta à proliferação celular mediada por *E7*. Esta oncoproteína se liga à proteína *p53*, uma proteína supressora de tumor que regula a expressão das proteínas responsáveis pelo controle do ciclo celular, causando sua degradação proteolítica via ubiquitinação. A ligação da proteína *E6* anula as propriedades de *p53* e interrompe sua habilidade de corrigir erros de duplicação, de bloquear o ciclo celular e de induzir a apoptose (DOORBAR *et al.*, 2012; NGUYEN; MÜNGER, 2009; YUAN *et al.*, 2012).

2.1.1 Ciclo biológico do HPV

Através de pequenos traumas que podem ocorrer na barreira epitelial, os vírus infectam as células da camada basal (STUBENRAUCH; LAIMINS, 1999). Inicialmente, após infecção, o HPV é mantido em baixo número de cópias, ficando a replicação viral dependente da replicação celular. Este período é conhecido como fase latente. Estudos relatam que o baixo número de cópias virais (10-200 cópias por células) nas células basais, favorece a manutenção da forma episomal, colaboram para a estabilidade genômica e dificultam a identificação da célula infectada pelo sistema de defesa do hospedeiro (DOORBAR, 2005; KADAJA *et al.*, 2009). O tempo de duração da fase latente pode variar de indivíduo para indivíduo. Ainda não se conhece o motivo, mas acredita-se que devido a alguma fragilidade imunológica, o HPV sai do estado de latência e, sob a forma episomal, entra em estado replicativo, agora de forma independente da divisão celular. Dá-se, então, início à fase proliferativa da infecção. Durante a proliferação viral, primeiramente ocorre um aumento da expressão dos genes *E1* e *E2*, seguido do aumento na expressão de *E5*, *E6* e *E7*, sendo *E4* o último gene precoce a ser expresso, já em células maduras, formando assim os coilócitos. Os últimos genes do HPV a serem expressos são *L1* e *L2*. É dentro do coilócito que estas proteínas se organizam formando o capsídeo e dando origem a uma nova partícula viral (vírion), a qual será liberada na superfície epitelial (Figura 3).

O aumento na expressão de *E1* e *E2* é necessário para o aumento do número de cópias virais (DOORBAR *et al.*, 2012). A replicação muito intensa do DNA viral proporciona níveis elevados de *E1* e o aparecimento de formas aberrantes por erros na duplicação e na transcrição, o que ameaça a estabilidade do genoma viral, sendo este um possível gatilho para a sua integração (KADAJA *et al.*, 2009).

Figura 3 - Infecção pelo HPV no colo do útero, diferenciação dos queratinócitos e expressão das proteínas virais



O HPV pode-se ligar a receptores na membrana basal (linha cinza) e infectar as células da camada basal do epitélio. Alternativamente, o HPV também pode entrar nas células da junção escamo-colunar (HERFS *et al.*, 2012). A divisão das células epiteliais basais infectadas pode dar origem a uma célula amplificadora transitória que é capaz de se diferenciar. Os genomas virais são segregados em células filhas após a divisão celular basal e podem ser transportados para as camadas epiteliais superiores. O processo de diferenciação dos queratinócitos permite um padrão de expressão gênica viral conforme indicado no lado direito. As células são mostradas em bege, núcleos em rosa e partículas de vírus em azul claro. A membrana basal é mostrada como uma linha cinza. Os receptores de entrada são mostrados como uma linha com um arco acima.

Fonte: adaptado de GRAHAM, 2017, p. 2206.

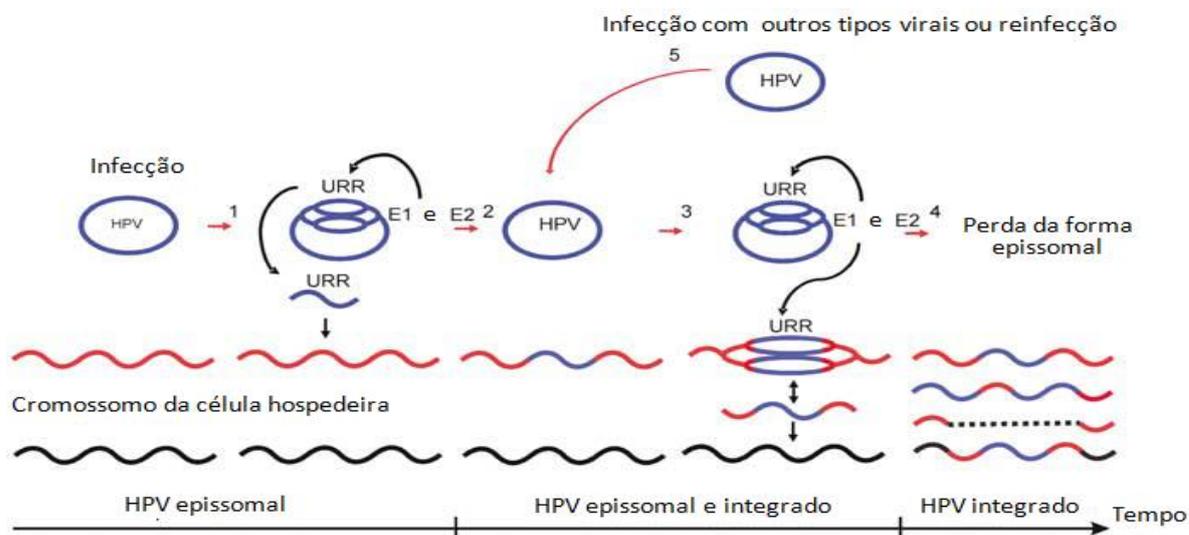
Existem evidências de que o processo de integração do genoma do HPV ao do hospedeiro (Figura 4, passos 1 e 2) é gradativo, podendo ocorrer em qualquer fase do processo infeccioso e estando presente desde células normais até às tumorais. É sabido também que a integração viral contribui significativamente para o processo carcinogênico atuando basicamente de 2 formas: 1) com a linearização do genoma viral, os genes *E1* ou *E2* são danificados e todo o mecanismo de regulação da replicação e transcrição viral pode ser perdido. A proteína *E2* atua como o principal inibidor da expressão de *E6* e *E7* e, como consequência, estas proteínas aumentam significativamente em número acelerando o processo de transformação; 2) estudos mostram ser importante também para a carcinogênese, o local onde o vírus se integra, podendo haver ativação de genes oncogênicos e inativação de supressores de tumor, não só pelo processo de integração em si, mas também pelas metilações que irão

ocorrer nas regiões flanqueadoras (DOORBAR *et al.*, 2012; MCBRIDE; WARBURTON, 2017).

A forma mista, portanto, é uma forma considerada intermediária entre a epissomal, encontrada em lesões mais simples, e a integrada, frequente em lesões mais graves e cancerosas (Figura 4, passos 2 e 3).

Kadaja *et al.* (2007) investigaram a expressão concomitante de genes pelas formas virais epissomais e integradas, algo semelhante à infecção mista. 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. Através dos resultados obtidos, os autores propuseram o modelo ilustrado na Figura 4. Os experimentos demonstraram que o genoma do HPV integrado permanece ativo e disponível à replicação e transcrição, sendo controlado pelas proteínas E1 e E2, as quais são produzidas pela forma epissomal. O material genético integrado, assim duplicado, conterá o genoma do HPV integrado, como também as regiões flanqueadoras, pertencentes ao genoma do hospedeiro, gerando um intermediário replicativo, ainda ligado ao genoma da célula hospedeira. Esse genoma amplificado será novamente integrado ao genoma do hospedeiro, aumentando assim o número de cópias virais e intensificando o processo de integração. Os autores chamaram este mecanismo de formação “*de novo*” (Figura 4, passo 3). O aumento do número de cópias do HPV integrado promove um aumento da quantidade das proteínas E6 e E7 disponíveis, aumentando mais a instabilidade genômica. A atuação das proteínas oncogênicas, conjuntamente com a ocorrência de vários eventos de integração viral “*de novo*”, promovem ganhos e perda de função de genes do hospedeiro e favorecem o processo de carcinogênese. Infecções causadas por tipos diferentes de HPV, ou uma reinfecção pelo mesmo tipo viral, podem mimetizar o que ocorre na forma mista da infecção, contribuindo também para aumentar o estado de instabilidade genômica celular (Figura 4, passo 5). Com a integração total das formas epissomais (Figura 4, 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 (DOORBAR, 2005).

Figura 4 - Instabilidade genômica da célula hospedeira induzida pela maquinaria de replicação do HPV



Infecção e instabilidade genômica promovida pelo HPV (passos 1, 2 e 3). Transição entre os estados físicos epissomal (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).

Fonte: adaptado de Kadaja *et al.*, 2007, p. 2188.

Os HPVs de alto risco são mais eficientes na transformação celular e na manutenção do estado proliferativo. Uma explicação para esse fenômeno se deve à atividade das oncoproteínas E6 e E7, que apesar de estarem presentes também nos HPVs de baixo risco, tem seu papel limitado para desencadear o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e câncer por estes tipos virais (SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

Existem algumas estratégias utilizadas pelos HPVs de alto risco, para evitar a sua detecção pelo sistema imune do hospedeiro; uma delas é manter um perfil muito baixo de cópias virais (STANLEY; PINTO; TRIMBLE, 2012). A retenção intracelular dos antígenos virais também pode comprometer a detecção do vírus pelo sistema imune (BRYAN; BROWN, 2001). Além disso, o HPV possui mecanismos que limitam a apresentação de epítomos, nas camadas mais baixas do epitélio (GRABOWSKA; RIEMER, 2012; HOWIE *et al.*, 2009), sendo estes fatores importantes para a persistência viral e progressão para as doenças neoplásicas.

A integração do HPV ao genoma humano também tem sido associada à manutenção da infecção persistente (MANAWAPAT *et al.*, 2012), sendo essa considerada o principal fator para o desenvolvimento do câncer cervical (WALBOOMERS *et al.*, 1999).

2.2 Doenças causadas pelo HPV na população masculina

A infecção genital por HPV é muito comum em homens podendo progredir para as seguintes formas: 1) condiloma acuminado, a lesão mais frequente nesta população; 2) Neoplasias Intraepiteliais que podem ser penianas (NIP) ou Neoplasias Intraepiteliais Anais (NIA), sendo estas consideradas lesões precursoras do câncer peniano HPV dependente e anal, respectivamente, algo similar ao que ocorre nas mulheres; 3) Câncer, que pode ser peniano, anal e de cabeça e pescoço (CUBILLA; VELAZQUEZ; YOUNG, 2004).

2.2.1 Condiloma acuminado

Visivelmente e de forma clínica, A infecção pelo HPV pode manifestar-se como condiloma acuminado, uma lesão vulgarmente conhecida como verruga anogenital (COSTA-SILVA *et al.*, 2017). O condiloma acuminado pode ser confundido com outras lesões papilares tais como o molusco contagioso, a ceratose seborréica, o líquen plano, e até mesmo alguns tipos de cânceres de células escamosas. Por este motivo, necessita de diagnóstico diferencial. Muitas vezes a classificação é confusa e controversa, devido à semelhança histopatológica dessas lesões (CHAN, 2018).

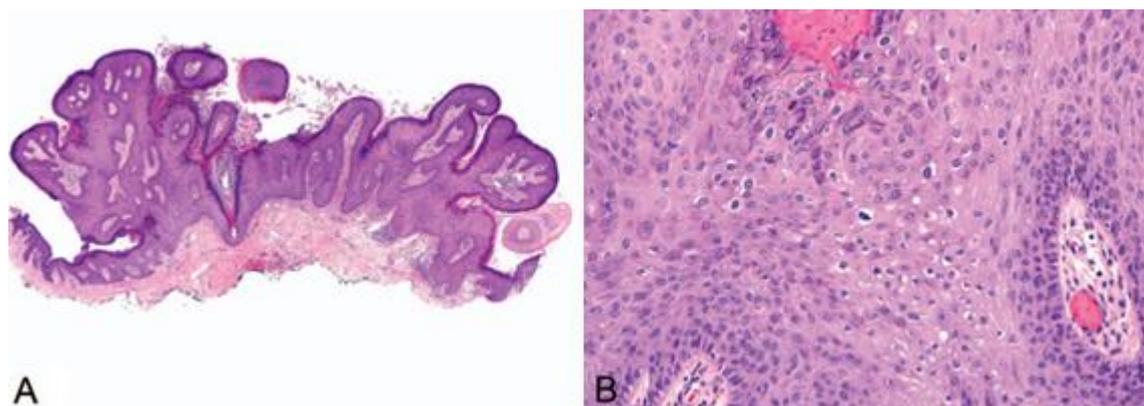
O condiloma acuminado se apresenta na forma de pápulas únicas ou múltiplas, e se desenvolvem em toda a região genital como no períneo, ânus, pênis, escroto e uretra, assim como em toda a cavidade oral, acometendo boca, faringe e laringe. Os sintomas clínicos destas lesões podem incluir prurido, sensação de queimação e sangramento (GROSS; PFISTER, 2004; INSINGA *et al.*, 2003 *apud* PATEL *et al.*, 2013).

O epitélio do condiloma acuminado é acantótico com grau variável de papilomatose. Comparado com as papilas "pontiagudas" em verruga vulgar, as papilas do condiloma acuminado são mais arredondadas, com contornos ondulantes, e com hiperkeratose menos robusta (NUOVO *et al.*, 1989) (Figura 5).

Os HPVs-6 e 11 são responsáveis por aproximadamente 90% dos casos de condiloma acuminado (da SILVA *et al.*, 2017; GIULIANO *et al.*, 2008; SCHILLER; LOWY; MARKOWITZ, 2013). Há evidências de associação entre indivíduos com histórico de condiloma acuminado e o aumento do risco de desenvolvimento de câncer. Diversos estudos sugerem que, múltiplas infecções com HPVs de alto risco

conferem ao condiloma acuminado um risco potencial para o desenvolvimento de tumores malignos (BENNETS *et al.*, 2015; BLOMBERG *et al.*, 2012; POW-SANG *et al.*, 2010). Anic *et al.* (2011) em seu estudo realizado com homens de diversas nacionalidades, detectou múltiplas infecções dos HPVs-16 e 18 e HPVs-6 e 11 em 12,5% dos condilomas acuminados.

Figura 5 - Representação histológica do Condiloma Acuminado



(A) Pápula papilomatosa típica com hiperqueratose leve. As papilas têm pontas arredondadas e núcleos fibrovasculares proeminentes. (B) Coilocitos contendo núcleos aumentados, irregulares e hiper cromáticos, halos perinucleares e cerato-hialina grossa. Os grânulos são encontrados nas camadas espinhosas granular e superior. O resto dos queratinócitos parecem normais. Coloração por hematoxilina-eosina, ampliações de A (x40) e B (x400).

Fonte: adaptado de Chan, 2018, p. 4.

O termo verruga também é utilizado, em alguns casos, como sinônimo de condiloma acuminado, causando certa confusão. A verruga (*verruca vulgaris*) ocorre em regiões extragenitais e da pele, geralmente em áreas de atrito como cotovelos, joelhos e dedos. Já o condiloma acuminado é uma lesão que ocorre nas mucosas das regiões anogenitais e orais. Tanto o condiloma acuminado quanto a verruga são causados por HPV de baixo risco. No entanto, em contraste com o condiloma acuminado que é predominantemente causado pelos HPVs-6 e 11, a verruga é mais comumente induzida por HPV-2, seguido por HPV-1, 4, 65 e 27, entre outros tipos (HAGIWARA *et al.*, 2005). A morfologia das verrugas e dos condilomas acuminados são semelhantes, ambos se apresentam como pápulas exofíticas e verrucosas, mas a verruga tende a ser mais hiperqueratótica do que o condiloma acuminado (CHAN, 2018) (Quadro 1).

Já o papiloma é uma lesão proliferativa benigna que pode ser ou não provocada pelo HPV, e é frequentemente encontrada no epitélio oral (SYRJÄNEN, 2003). Histologicamente, apresenta uma discreta estrutura exofítica e papilar, e um

pedúnculo que geralmente é visualizado como um espaço entre as folhas papilomatosas, compostas de um tecido epitelial com diferentes graus de queratinização e por um conjuntivo normal (EVERSOLE, 2000) (Quadro 1).

Quadro 1 - Resumo das características clínicas e histopatológicas do Condiloma Acuminado, Verruga e Papiloma anogenitais

Características	Condiloma acuminado	Verruga (<i>verruca vulgaris</i>)	Papiloma
Faixa etária de pico	Terceira década	Crianças	Sexta a sétima década
Região anogenital comumente afetada	Qualquer região	Qualquer região	Glande do pênis
Tamanho	Pequena pápula	Pequena pápula	5.6 cm (média)
Formato das papilas	Pontas arredondadas	Delgado com pontas pontiagudas	Formatos irregulares e de comprimentos variáveis
Núcleos fibrovasculares	Proeminente	Proeminente, contendo capilares dilatados	Variável
Hiperqueratose	Geralmente leve	Colunas de paraqueratose sobre pontas de papilas	Variável
Base do tumor	Ondulante, redondo	Convergência de longo, cristas pontiagudas	Esfarrapado e infiltrativo
Coilocitose	Presente	Presente, mas pode ser sutil	Ausente

/continua

Mitoses	Poucos, confinados ao terço inferior do epitélio	Raro	Variável
Outras características	Não aplicável	Hipergranulose acentuada em “vales” entre papilas	Não aplicável
Associação com HPV	HPV de baixo risco (comuns tipo 6/ 11)	HPV de alto risco (comumente tipo 2)	Não

Fonte: adaptado de Chan, 2018, p. 2-3.

A incidência de condilomas é maior nos homens mais jovens (< 30 anos) e decresce significativamente com a idade (ANDERSON *et al.*, 2009; ANIC *et al.*, 2012; da SILVA *et al.*, 2017; LAZCANO-PONCE *et al.*, 2018).

Condilomas acuminados são mais frequentemente diagnosticados com base em sua aparência clínica, com aspecto semelhante a couve-flor, sendo que testes para a presença de HPV não são recomendados. O exame histológico pode ser realizado para se descartar a presença de neoplasias intraepiteliais e de carcinomas, e para diagnósticos diferenciais. É possível a coexistência de diferentes lesões em uma mesma amostra (BLOMBERG *et al.*, 2012).

Blomberg *et al.* (2012) realizaram um estudo com objetivo de se avaliar o risco de desenvolvimento de câncer em homens e mulheres com o diagnóstico prévio de verrugas genitais. Um total de aproximadamente 50.000 pacientes (33% homens e 67% mulheres) foram incluídos no estudo. O tempo médio de seguimento foi de 12 anos para homens e de 13 anos para mulheres. No total, foram observados 2.363 casos de câncer. A estimativa de risco mais alta foi encontrada para o câncer anal em homens, onde foram diagnosticados 29 casos, sendo uma incidência de risco padronizada de 21,5, e em mulheres de 7,8. O valor da incidência de risco padronizada para câncer de pênis foi de 8,2. Para os demais tipos de câncer a incidência encontrada foi de 14,8 para o câncer vulvar; 5,9 para câncer de vagina, 1,5 para o câncer cervical e de 2,8 para o câncer de cabeça e pescoço.

Baydar *et al.* (2013) buscaram em seu trabalho determinar a incidência de displasias em homens portadores de condilomas penianos associados a HPVs de alto risco. Neste trabalho, as displasias foram observadas em 13 das 58 amostras de condilomas (22%) e HPVs de alto risco foram encontrados em 5 das 10 amostras displásicas (50%). Os autores consideraram que a investigação dos tipos de HPV presentes em condilomas é de suma importância para o acompanhamento do paciente e prevenção de recorrências.

Cho *et al.* (2017) realizaram um estudo nacional em Taiwan, para analisar o risco de malignidades, entre homens e mulheres com diagnóstico prévio de verrugas genitais. Entre janeiro de 2000 e dezembro de 2013, aproximadamente, 3 milhões de pacientes foram avaliados. Destes pacientes, 21.763 foram diagnosticados com verrugas genitais. No mesmo período, um total de 21.354 casos de câncer foram relatados, dos quais 1.002 foram registrados entre os pacientes com verrugas genitais. Foi encontrado um aumento no risco de desenvolver câncer anogenital relacionado ao HPV, nesses pacientes com verrugas genitais prévias.

Uma hipótese elaborada para expressar a razão de pacientes infectados por vírus de baixo risco oncogênico evoluírem para o câncer seria a condição imunológica do indivíduo, onde a supressão ou redução da resposta imunológica local, poderia favorecer a persistência e a multiplicação do HPV de baixo risco, aumentando as chances de desenvolver o câncer (BLOMBERG *et al.*, 2012; SHACTER; WEITZMAN, 2002). Verrugas anogenitais são mais frequentes em pacientes imunodeficientes, portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (HIV-positivos), se comparados com indivíduos HIV-negativos, observando-se também maiores recidivas dessas lesões e presença de displasias de alto grau nesses pacientes (18 a 56% das verrugas anogenitais apresentaram displasias) (KREUTER *et al.*, 2016; WIELAND; KREUTER, 2017).

Esta lesão não está associada à mortalidade, mas são consideradas um grande problema de saúde pública, pois podem desencadear problemas psicossociais com redução da qualidade de vida, além de gerar custos para o estado e o indivíduo (CHONDROS *et al.*, 2018; PATEL *et al.*, 2013).

Domenech-Viñolas *et al.* (2018), em estudo realizado no México, verificaram que o impacto psicossocial causado pela presença dos condilomas acuminados foi ligeiramente maior no sexo masculino do que no feminino, e que o custo anual estimado com o tratamento dessas lesões, foi de US\$ 195 milhões. 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, verificou 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).

O tempo médio relatado entre a infecção por esses tipos, e o desenvolvimento de verrugas genitais é de 11 a 12 meses em homens e 5 a 6 meses em mulheres. E aproximadamente um terço das verrugas penianas regride sem tratamento, sendo que a média de tempo da resolução é de aproximadamente 9 meses (PATEL *et al.*, 2013). Os tratamentos consistem na destruição do tecido afetado e estão associados com reações locais na pele, incluindo prurido, queimação e algumas vezes, erosões e dor. Em geral, tem-se como tratamentos a aplicação tópica de substâncias citotóxicas, a crioterapia, a laserterapia ou a remoção cirúrgica de qualquer lesão visível (LACEY *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2015; STERN *et al.*, 2012; YUAN *et al.*, 2018).

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. Um estudo de Giuliano *et al.* (2019), mostrou que há uma maior recidiva das verrugas genitais em homens: observou-se uma alta taxa de episódios repetidos de verrugas genitais em 44,3% dos homens.

Em um estudo de Mann *et al.* (2018), realizado nos EUA em 27 clínicas que atenderam pacientes com infecções sexualmente transmissíveis, entre 2010 e 2016, observou-se um declínio na prevalência de verrugas anogenitais em todas as faixas etárias, mas a queda foi mais expressiva em mulheres com idade <40 anos e em homens que tem relações sexuais apenas com mulheres com idade <40 anos e homens que tem relações sexuais com homens em todas as faixas etárias. Os autores relatam que a causa desta queda não é clara, mas sugerem que a morbidade causada pelo HPV está diminuindo entre os pacientes que frequentam as clínicas de IST, e que é provável que algumas das diminuições observadas possam estar relacionadas com a cobertura vacinal do HPV.

2.2.2 Neoplasias intraepiteliais

As neoplasias intraepiteliais no homem podem ocorrer tanto na região anal (NIA) quanto na região peniana (NIP). As NIAs são mais bem estudadas que as NIPs e, a maior parte dos estudos se concentram na população de homens que praticam sexo com outros homens, e em portadores do HIV (CLARKE; WENTZENSEN, 2018; DAVIS; ORANGIO, 2018).

A Neoplasia Intraepitelial Peniana (NIP) é uma lesão pré-maligna que pode afetar a glândula, o prepúcio ou o eixo do pênis (ZREIK *et al.*, 2017). Apesar de ser rara, a incidência dessa lesão vem aumentando nas últimas décadas, sendo que o risco para uma evolução maligna é de 30% (RODNEY; ARYA; MUNEER, 2017; SPIESS *et al.*, 2016).

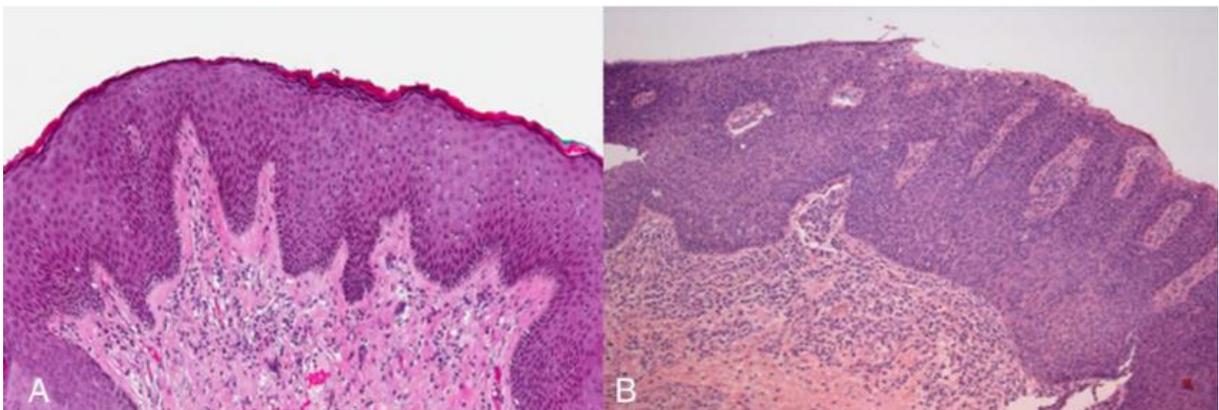
O diagnóstico e o tratamento precoces são importantes para se prevenir a progressão para o carcinoma invasivo de células escamosas, e se reduzir a necessidade de cirurgias mutiladoras. Porém, o seu diagnóstico é difícil, pois pode apresentar características variadas, dificultando a sua identificação e diferenciação com outras dermatoses genitais, tais como psoríase, verrugas genitais, erupção medicamentosa, ceratose seborreica, entre outros (CHAN *et al.*, 2018).

As NIPs, assim como as lesões cervicais, podem ser classificadas pela histopatologia em NIP I, II e III de acordo com o grau de comprometimento da espessura epitelial pelas células alteradas. Também podem ser classificadas como lesões escamosas intraepiteliais de baixo e alto grau (CUBILLA; VELAZQUEZ; YOUNG, 2004). Condilomas planos ou papilomatosos podem ser classificados como lesões de baixo grau. As lesões de alto grau apresentam atipias mais frequentes e acentuadas. Estudos estimam que cerca de 60-100% das NIPs são positivas para o DNA-HPV (AYNAUD *et al.*, 1994; da SILVA *et al.*, 2017; KRUSTRUP *et al.*, 2009; RUBIN *et al.*, 2001; SUDENGA *et al.*, 2016; WIELAND *et al.*, 2000).

Três variantes clinicamente distintas constituem a maioria dos casos de NIP: a doença de Bowen, a eritroplasia de Queyrat e a papilomatose bowenóide. Estas diferem em sua epidemiologia, associações etiológicas e prognóstico. Histopatologicamente, essas variantes podem ser indistinguíveis, sendo semelhantes ao carcinoma peniano *in situ*, que pode ser subdividido em subtipos diferenciados e indiferenciados (CHAN *et al.*, 2018; SPIESS *et al.*, 2016).

As NIPs classificadas como diferenciadas, não estão associadas ao HPV, já as indiferenciadas/ bowenóides são HPV dependentes. As NIPs diferenciadas são caracterizadas pela presença de: acantose, maturação epitelial anormal com atipia celular nas regiões basais/parabasais ou acima dessas, queratinócitos amplos com abundante eosinofilia citoplasmática, pontes intercelulares proeminentes, núcleos vesiculares e ocasionais nucléolos proeminentes, hiperkeratose e formação de pérolas córneas. Já as NIP indiferenciadas/ bowenóides podem apresentar três variantes: 1) NIP basalóides, 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 paraceratose e coilocitose focal; 2) NIP condilomatosa, caracterizada por epitélio espessado, com paraceratose, pleomorfismo celular, coilocitose e diskeratose; 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 as NIPs condilomatosa e basalóide são encontradas mais frequentemente acompanhando os carcinomas condilomatosos e/ou basalóides. A classificação em NIP diferenciada e indiferenciada seria mais apropriada, visto que, na opinião de alguns autores, ela reflete melhor a patogênese e a história natural destas lesões (BRADY *et al.*, 2012; CHAUX *et al.*, 2012; RENAUD-VILMER *et al.*, 2010; SPIESS *et al.*, 2016) (Figura 6).

Figura 6 - Representação histológica das Neoplasias Intraepiteliais Penianas



(A) Hiperplasia escamosa mostrando ausência de atipias, (B) Neoplasia Intraepitelial Peniana Basalóide com pequenas células azuis e alta taxa de mitoses. Coloração por hematoxilina-eosina, ampliações de A e B (x10).

Fonte: adaptado de Downes, 2015, p.335.

Alguns estudos buscam determinar a incidência de lesões genitais externas associadas ao HPV e sua progressão, principalmente lesões do tipo de condiloma acuminado e NIP. Observou-se que o condiloma é causado principalmente por HPVs de baixo risco, como HPV-6 ou HPV-11, enquanto as NIPs são principalmente associadas com tipos de alto risco (CHAN *et al.*; 2009; HAWKINS *et al.*, 2013). No entanto, no trabalho de Ingles *et al.* (2015), 14 amostras foram diagnosticadas como NIP, sendo que em 50% dessas lesões foram encontrados HPVs do tipo 6 e 11 em infecções múltiplas com outros tipos virais de HPV de alto risco. No entanto, é interessante notar que duas amostras com NIP, neste estudo, continham apenas um único genótipo de baixo risco (HPV-6 ou 11). O HPV-6 foi encontrado como uma única infecção em uma lesão NIP III, e o HPV-11 foi encontrado como uma única infecção em uma lesão NIP I.

Sudenga *et al.* (2016), tiveram como objetivo detectar a presença de HPV genital em homens e a possível progressão para dois tipos de lesões: condiloma e NIP, a serem confirmadas histopatologicamente. Neste estudo, 1.788 homens com infecção por HPV foram acompanhados. Durante o acompanhamento, 5% desenvolveram lesão genital (86 homens tinham condiloma e 9 homens apresentaram lesões NIP). A maioria das lesões de NIP foi positiva para HPV-16 (60%) e, destas, 33% também foram positivas para HPV-6 ou HPV-11. Infecções únicas com HPV-11 e HPV-6 em lesões NIP I e NIP III, respectivamente, também foram observadas. A presença de apenas um tipo viral de baixo risco nessas lesões pré-cancerosas é consistente com resultados publicados previamente, nos quais esses tipos de lesões de alto-grau, embora raramente, podem ser associados a um único tipo viral de HPV baixo-risco (CORNALL *et al.*, 2013; GUIMERA *et al.*, 2013).

Da Silva *et al.* (2017) também buscaram determinar entre homens saudáveis, residentes no Brasil a incidência de lesões genitais externas, condilomas, NIPs e progressão da infecção pelo HPV para algum tipo de lesão. Entre os 1.118 homens, 73 pacientes (7%) desenvolveram algum tipo de lesão durante o acompanhamento. Os homens desenvolveram principalmente condiloma, o número amostral (n) foi de 36, lesão sugestiva de condiloma (n=27), NIP (n=6) e lesão não relacionada ao HPV (n=20). Entre as 6 NIPs prevalentes e incidentes, 100% foram positivas para HPV e 66,7% foram positivas para ≥ 1 genótipo de HPV de alto risco. O HPV-16 e HPV-18 foram detectados em duas (33,3%) e uma (16,7%) das lesões de NIP, respectivamente. Além disso, dois outros HPVs de alto risco também foram

detectados em lesões NIP: o HPV-39 foi encontrado em duas amostras, enquanto o HPV-68 foi detectado em uma amostra. Os tipos de HPV de baixo risco foram encontrados principalmente nas lesões de NIP com múltiplas infecções com um HPV de baixo risco. No entanto, o HPV-6 foi detectado como uma única infecção em uma das lesões NIP I e uma NIP III.

Estudos também mostram a diferença significativa de idade ao comparar homens que desenvolveram NIP e os que não desenvolveram. Sendo que homens mais jovens (<30 anos) foram mais propensos a desenvolver a lesão (15,2% a mais) (INGLES *et al.*, 2015; SUDENGA *et al.*, 2016).

Para o tratamento dessas neoplasias são utilizadas duas principais substâncias tóxicas: 5-fluorouracil (5-FU) e o imiquimode. O fluororacil exerce seus efeitos quimioterápicos através da inibição da enzima timidilato sintetase (EAGLSTEIN; WEINSTEIN; FROST, 1970 *apud* MANJUNATH *et al.*, 2017; MICALI *et al.*, 2014). O imiquimode é uma droga imunomoduladora que age em vários níveis do sistema imune adaptativo (DEEN; BURDON-JONES, 2017). Outros tratamentos como a terapia fotodinâmica são usados, mas em menor grau (KORBELIK, 2011; ST DENIS *et al.*, 2011 *apud* MANJUNATH *et al.*, 2017).

Apesar das NIPs serem um evento raro na população, é importante que estudos sejam realizados para investigar o papel dos vírus de alto e baixo risco nessas lesões, e também o papel das múltiplas infecções no desenvolvimento dessas lesões.

2.2.3 Câncer

O HPV na população masculina pode provocar diferentes tipos de câncer: o peniano, o anal e o de cabeça e pescoço. As taxas de incidência mundial determinadas em 2012 para esses tipos de câncer são muito mais baixas quando comparadas à do câncer do colo do útero. Globalmente, nos homens, 60.000 casos de câncer associados ao HPV foram diagnosticados, 17.000 no ânus e 13.000 no pênis. Sobre a relação do HPV a esses dois tipos de tumores, 87% dos casos de câncer anal e 50% dos casos de câncer peniano encontram-se associados ao HPV. Os cânceres de cabeça e pescoço representam um grupo grande e heterogêneo de neoplasias malignas, para as quais o consumo de tabaco e álcool há muito tem sido reconhecido como causa predominante em todo o mundo. No entanto, uma fração desses cânceres é causada pelo HPV, particularmente o de orofaringe e, em uma

menor proporção, o câncer da cavidade oral e da laringe. Globalmente, 534.000 casos de câncer de cabeça e pescoço são diagnosticados, com apenas 37.200 casos (7%) atribuíveis ao HPV, sendo que destes 30.200 (81%) ocorrem em homens (DE MARTEL *et al.*, 2017).

Segundo dados mundiais, no ano de 2012, o continente com maior ocorrência de câncer peniano foi a Ásia, sendo a Índia o país com taxa mais alta, 3.200 casos, seguida pela Europa com 2.700 e a América Latina com 2.000 casos (DE MARTEL *et al.*, 2017). É uma neoplasia rara e representa menos de 1% de todas as neoplasias malignas de ocorrência na Europa e nos Estados Unidos, mas nos países em desenvolvimento apresenta risco significativo (DOUGLAWI; MASTERSON, 2017). No Brasil, tem uma maior incidência com 2,8 a 6,8 casos por 100.000 homens, sendo considerado o 4º tumor mais comum na população masculina (COUTO *et al.*, 2014; FAVORITO *et al.*, 2008), uma das mais altas taxas do mundo (PARKIN *et al.*, 2008).

Embora, o câncer peniano seja altamente tratável em seus estágios iniciais, seu diagnóstico, geralmente é difícil e tardio, e o tratamento muitas vezes confere consequências físicas e psicológicas. Além disso, devido ao estigma social da doença, existe um retardo na procura por tratamento de até 1 ano em 15 a 50% dos pacientes (MISRA; CHATURVEDI; MISRA, NC, 2004).

Em relação a região anatômica acometida pelo câncer peniano, 48% acometem a região da glândula, seguida pelo prepúcio (21%), glândula e prepúcio (9%), sulco coronal (6%) e mais raramente no corpo (<2%). O subtipo histológico mais comum diagnosticado no carcinoma peniano é o carcinoma de células escamosas, sendo responsável por 95% do diagnóstico (MOSCONI *et al.*, 2005 *apud* DOUGLAWI; MASTERSON, 2017). A presença de condiloma acuminado aumenta em 3,7 o risco de desenvolver o carcinoma. O HPV-16 e 18 são os tipos mais comuns encontrados (60% e 13%, respectivamente) (CUBILLA *et al.*, 2011; FERNÁNDEZ-NESTOSA *et al.*, 2017; POW-SANG *et al.*, 2010).

Acredita-se que a menor incidência observada deste tumor é devido à uma menor susceptibilidade dos tecidos presentes neste órgão à transformação maligna quando comparada ao colo do útero (PALEFSKY, 2007 *apud* PEDER *et al.*, 2018). Existem hipóteses que tentam justificar a possível resistência da mucosa peniana à ação oncogênica do HPV, e umas das teorias mais aceitas é a ausência nessa região anatômica da junção escamo-colunar (JEC). As células metaplásicas presentes nessa

junção possuem alto potencial de multiplicação e um microambiente próprio, o que facilita a infecção pelo HPV (HERFS *et al.*, 2012). Outros fatores que poderiam interferir na evolução das lesões na região peniana são a menor prevalência de infecções persistentes e o elevado *clearance* da infecção, devidos possivelmente a uma maior descamação das células epiteliais e à presença de menores cargas virais (GIULIANO *et al.*, 2011; MARKS *et al.*, 2011).

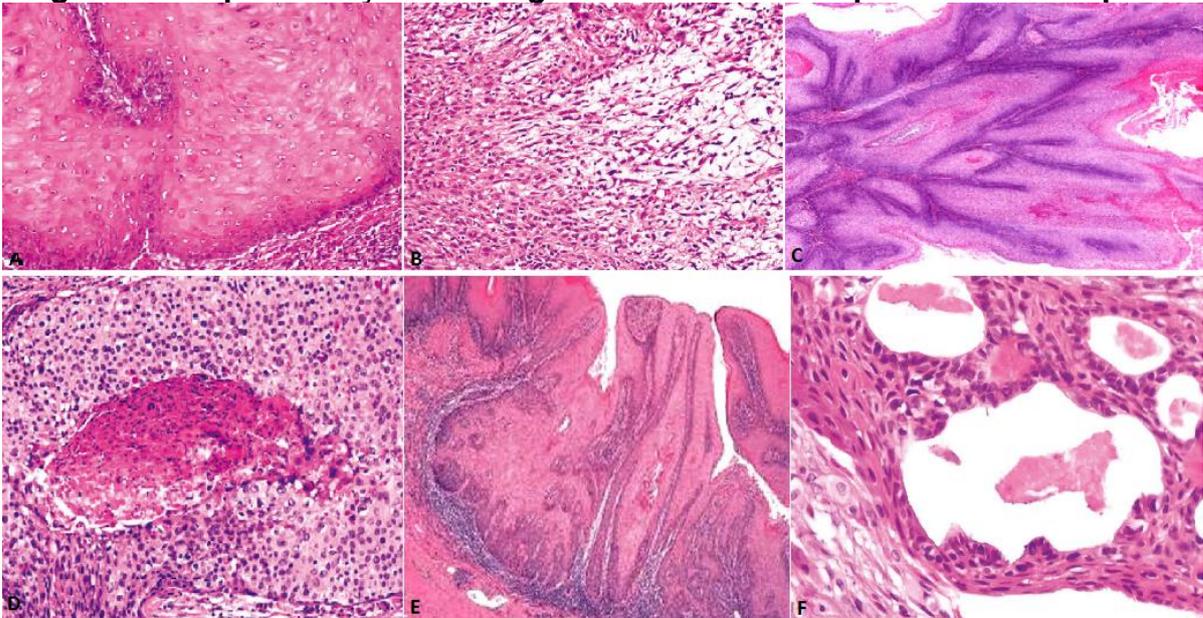
O câncer peniano é mais comum em homens com idade entre 50 e 70 anos (POW-SANG *et al.*, 2010), embora, qualquer homem possa ser afetado. Os fatores de risco responsáveis pelo aumento do risco em se desenvolver uma doença invasiva são: a fimose (responsável por 25-60% dos casos), a não-adesão à prática da circuncisão como fator protetor (essa atuaria como fator protetor uma vez que homens não circuncidados possuem risco para o câncer aumentado de 3 vezes), a obesidade, a falta de higiene, a imunossupressão e o tabagismo (> 10 cigarros por dia) que aumenta o risco em 2,14 vezes (DOUGLAWI; MASTERSON, 2017; POW-SANG *et al.*, 2010). Acredita-se que a circuncisão favoreça uma melhor higiene do órgão e diminua o risco de transmissão do HPV e do HIV, bem como reduza a inflamação crônica e a balanite (CHRISTODOULIDOU *et al.*, 2015).

Portadores do HIV, bem como receptores de órgãos transplantados são conhecidos por estarem em maior risco de adquirir o HPV e de desenvolverem lesões malignas (VIENS *et al.*, 2016). O mecanismo tem sido associado à imunossupressão e não por um efeito direto do HIV (GUIDRY; SCOTT, 2017; KELLY; MAYAUD; DE SANJOSÉ, 2015). Um estudo verificou que pacientes transplantados apresentaram um aumento 17 vezes no risco de infecção por HPV. Em pacientes HIV positivos foi encontrado um aumento da infecção por múltiplos subtipos de HPV, o que pode levar a um risco aumentado de desenvolver doença invasiva (MISRA, CHATURVEDI; MISRA, NC, 2004; VIENS *et al.*, 2016). Em estudos realizados na África, a incidência de HPV de alto risco foi maior em homens HIV positivos (42,0-72,9/100 pessoas ao ano) do que em homens HIV negativos (19,7-32,9/100 pessoas ao ano). Estudos conduzidos na Espanha relataram maior incidência de HPV em homens HIV positivos que fazem sexo com homens, se comparado com homens que tem relações sexuais com mulheres (respectivamente, 11,6 *versus* 5,1/100 pessoas) (GRAY *et al.*, 2010; MBULAWA *et al.*, 2012 *apud* TAYLOR *et al.*, 2016; TOBIAN *et al.*, 2012).

O carcinoma de células escamosas do pênis tem características biológicas, etiológicas e morfológicas heterogêneas, características essas que formam a base

para vários esquemas de classificação (CUBILLA *et al.*, 2018). Em razão a estas diferenças, o carcinoma peniano de células escamosas pode ser caracterizado como: carcinomas basalóide, condilomatoso, verrucoso, papilífero, sarcomatóide, misto e adenoescamoso (Figura 7).

Figura 7 – Representação histológica de carcinomas epidermóides do pênis



Carcinomas epidermóides penianos. (A) Verrucoso, (B) Sarcomatóide, (C) Condilomatoso, (D) Basalóide, (E) Papilífero e (F) Adenoescamoso.

Fonte: adaptado de Cubilla *et al.*, 2018.

Tumores basalóides e condilomatosos estão fortemente associados ao HPV (80-100%), sendo que em carcinomas penianos verrucosos a taxa de incidência é de 31-35%; em ambos os casos a presença do HPV-16 é de 60 a 70% (CUBILLA *et al.*, 2018; DALING *et al.*, 2005; GIULIANO *et al.*, 2008; DO *et al.*, 2013).

Em um estudo de meta-análise, Olesen *et al.* (2018) selecionaram 73 artigos publicados entre 1986 a 2017, com o objetivo de verificar a prevalência do DNA-HPV no câncer de pênis (52 estudos; n = 4199). A prevalência encontrada foi de 50,8%. As taxas mais elevadas de prevalência do DNA-HPV foram observadas nos carcinomas basalóides (84%) e no carcinoma verrucoso (75,7%). O tipo de HPV predominante no câncer de pênis foi o HPV-16 (68,3%) seguido pelo HPV-6 (8,1%) e o HPV-18 (6,7%). A prevalência de DNA-HPV nas amostras NIP foi de 79,8%.

Sakamoto *et al.* (2019) estudaram 34 casos de pacientes com carcinoma peniano, o DNA foi extraído de amostras parafinadas e genotipadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), onde foram testados 37 diferentes tipos de HPV. O DNA-HPV foi encontrado em 14 casos (41,1%) e HPVs de alto risco estavam

presentes em 12 casos (85,7%), sendo que estes se apresentavam como única infecção. O DNA do HPV-16 foi o mais prevalente entre os tipos de alto risco (64,3%). Apenas 2 amostras (14,3%) apresentaram positividade para DNA-HPV de baixo risco, porém esses casos apresentaram múltiplas infecções.

Quanto ao tratamento do câncer peniano, tem sido empregada a penectomia total ou parcial, o que acarreta impacto significativo na qualidade de vida do paciente, como dificuldades na micção, atividade sexual, além de transtornos psicossociais (ANTUNES; DALL'OGGIO; SROUGI, 2007; SHABBIR *et al.*, 2011). A radioterapia pode ser combinada com quimioterapia, se necessário. Atualmente sugere-se tratar a doença concomitantemente com radioterapia e o medicamento cisplatina (KORZENIOWSKI; CROOK, 2017).

Em relação ao câncer anal, sua prevalência vem aumentando constantemente. É uma das doenças mais comuns entre os adultos infectados pelo HIV e homens que fazem sexo com homens, mulheres com doença prévia relacionada ao HPV e em populações imunossuprimidas (não relacionadas ao HIV) (DAVIS; ORANGIO, 2018).

Na região anal, assim como no colo do útero, há uma zona de transformação entre o epitélio escamoso e o epitélio colunar do reto, que é suscetível à infecção pelo HPV e subsequente transformação (PALEFSKY; RUBIN, 2009). A neoplasia intraepitelial anal, assim como a NIP, é uma lesão precursora do câncer anal, sendo que mais de 90% dos casos estão associados ao vírus HPV-16 e 18 (DAVIS; ORANGIO, 2018).

No estudo de Cornall *et al.* (2013), DNA-HPV de baixo risco foram encontrados em carcinomas invasivos e em lesões intraepiteliais escamosas de alto grau em biópsias anal e perianal. Dos sete casos testados, 4 carcinomas invasivos foram positivos apenas para o HPV-6, sendo que em três casos não era sabido o status da infecção para HIV, e um caso apresentou-se como HIV negativo. Um carcinoma invasivo negativo para HPV, e duas lesões intraepiteliais escamosas de alto grau foram positivas apenas para o HPV-11, sendo um desses casos positivo para o HIV. A carcinogênese do HPV pode ser influenciada pela terapia anti-retroviral e/ou pelas interações com proteínas do HIV. Além disso, o controle imunológico reduzido associado à infecção pelo HIV pode permitir que infecções por HPV persistam por mais tempo e, assim, aumentar o risco de desenvolvimento do câncer. Estes

resultados demonstram que os HPVs-6 e 11 podem, ocasionalmente, estar associados com o desenvolvimento do câncer e lesões de alto grau.

2.3 Carcinogênese viral

Atualmente, é consenso na literatura mundial que a infecção persistente por HPVs de alto risco oncogênico é o fator mais importante na carcinogênese cervical, porém não é o único (MITRA *et al.*, 2016). Além de aspectos relacionados à própria infecção, como carga viral, frequência de integração, local de integração e infecção única ou múltipla, fatores ligados ao hospedeiro, como a imunidade, a genética, o status hormonal, a anatomia (presença de junção escamo-colunar) e o comportamento sexual, parecem influenciar os mecanismos que determinam a regressão ou a persistência da infecção e também a progressão para lesões precursoras ou câncer (CHOW *et al.*, 2010; DE SANJOSÉ; BROTONS; PAVÓN, 2018). A carcinogênese é um processo lento, que pode levar vários anos até que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor propriamente dito (ZARDO *et al.*, 2014). Evidências mostram uma resistência relativa da mucosa peniana à ação oncogênica provocada pelo HPV e ao surgimento do carcinoma invasivo (AYALA *et al.*, 2005).

Múltiplas infecções, carga viral e estado físico do DNA-HPV podem ser fatores que, em associação, permitam a avaliação de risco do paciente e possível evolução para câncer. Acredita-se que múltiplas infecções dificultem o surgimento de uma resposta imune eficaz, favorecendo a persistência da infecção e o aumento da carga viral. Acredita-se também que a presença de vírus de baixo risco em múltipla infecção com vírus de alto risco potencialize a ação carcinogênica destes últimos. Com o aumento da carga viral, a expressão e, por consequência, a quantidade das oncoproteínas presentes dentro das células aumentam, favorecendo o desenvolvimento e agravamento de lesões. Com o aumento da taxa de expressão gênica e replicação viral é dado o gatilho para o processo de integração, que se torna cada vez mais frequente, aumentando ainda mais a quantidade das oncoproteínas e acelerando o processo de transformação celular. A instabilidade genômica criada pela ação destas oncoproteínas favorecem o surgimento e acúmulo de mutações transformando a célula hospedeira normal em uma célula neoplásica.

2.3.1 Múltiplas infecções

Alguns autores consideram a infecção múltipla como um fator de risco que pode levar à carcinogênese, e que o câncer do colo do útero está frequentemente associado à infecção por múltiplos tipos de HPV (DICKSON *et al.*, 2014). Wentzensen *et al.* (2009), relatou que a maioria dos casos de câncer cervical invasivo se tornam cada vez mais progressivos, devido a prevalência de múltiplos tipos de HPV.

Existem 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).

Alguns estudos relatam que as infecções por HPV com múltiplos tipos, são aparentemente mais facilmente transmitidas de parceiro a parceiro, o que também torna o estudo de infecções múltiplas importante (SOHRABI *et al.*, 2017).

Acredita-se que o aumento do risco no desenvolvimento de neoplasias se deve à potencialização da ação carcinogênica dos HPVs de alto risco presentes em múltiplas infecções, ou à presença de uma deficiência imunológica prévia e não a uma ação direta destes tipos virais (BENNETTS *et al.*, 2015).

Em contrapartida, trabalhos conduzidos tanto em homens (VACCARELLA *et al.*, 2011), quanto em mulheres (CHATURVERDI *et al.*, 2011), demonstraram que infecções por vários tipos de HPV ocorrem ao acaso, e que há pouca evidência de aumento de susceptibilidade/exclusão competitiva, ou de proteção cruzada com qualquer tipo específico de HPV. Dessa forma, consideram que aspectos como comportamento sexual e a resposta imunológica podem influenciar na prevalência de múltiplas infecções (CHATURVERDI *et al.*, 2011).

Sohrabi *et al.* (2017) buscaram determinar a presença de múltiplas infecções, em amostras de raspado cervical de mulheres que não apresentavam lesão cervical maligna. Foram genotipados 21 tipos de HPV através da técnica de Hibridização de produtos de PCR com sondas tipo-específicas. Foram incluídas no estudo 563 amostras, onde 40,59% tinham algum tipo de DNA-HPV, presentes em 70,69% com infecção única, 28,42% em infecções múltiplas e em 0,89% os HPVs não puderam ser tipados. Os 5 tipos de HPV encontrados predominantemente nas infecções foram os HPVs 6, 11, 31, 16 e 53, os quais foram encontrados em 52,35% dos casos HPV positivos.

Xi *et al.* (2009) e Wheeler *et al.*, (2009) relatam a existência de proteção cruzada entre HPVs filogeneticamente próximos.

Em seu trabalho, Hajia e Sohrabi (2018) buscaram definir quais os tipos de HPV estavam presentes em um grupo de mulheres com neoplasia genital, e se estes vírus possuíam interações sinérgicas quando em múltiplas infecções. Os tipos encontrados foram HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-31 e HPV-53. O HPV-16 foi detectado na maior parte das múltiplas infecções juntamente com os tipos 31, 52, e 53, enquanto o HPV 53 apareceu ligado ao HPV 16, 51 e 56 em infecções concomitantes. Concluiu-se que o HPV-16 e o HPV-53 podem ter tendências significativas para se manterem em múltiplas infecções, quando comparado com outros genótipos.

Senapati *et al.* (2017) estudaram 346 amostras femininas, 172 casos de câncer invasivo e 174 com citologia normal. As amostras foram genotipadas para 15 tipos diferentes de HPV (HPV-16, 18, 51, 39, 66, 68, 45, 35, 6/11, 58, 43 e 42), sendo que estes foram divididos de acordo com seu grupo filogenético. A prevalência de múltiplas infecções foi encontrada em 23,41% das amostras, enquanto a prevalência de infecção única foi de 76,59%. Não houve diferença significativa entre a prevalência de múltiplas infecções em amostras de câncer, e em amostras com citologia normal. No entanto, múltiplas infecções com genótipos específicos foram associadas ao carcinoma cervical. Casos com genótipos filogeneticamente relacionados apresentaram risco 2,9 vezes maior de estarem em múltipla infecção no carcinoma invasivo, do que aqueles infectados com outros genótipos.

Múltiplas infecções também foram associadas quanto ao resultado da progressão e do tratamento em câncer cervical.

Kaliff *et al.* (2018) estudaram a prevalência e a distribuição dos tipos de HPV em 204 amostras de câncer cervical, por meio da técnica de PCR em tempo real. Foi avaliada também a influência do HPV no prognóstico dos pacientes. Os resultados mostraram que a prevalência do HPV foi de 93%, sendo que 13% apresentaram múltiplas infecções, tipicamente com dois tipos de HPV de alto risco. Pacientes com tumores contendo vários tipos de HPV, e particularmente genótipos de HPV pertencentes às espécies alfa 7 e 9 juntos, tiveram uma taxa significativamente maior de recidivas do tumor, e pior taxa de sobrevida específica do câncer.

Munagala *et al.* (2009) tiveram como objetivo determinar a relação entre a prevalência do tipo de HPV e a resposta ao tratamento com radioterapia. No total, 40

de 43 amostras foram positivas para HPV, sendo a tipagem realizada pelo método de PCR multiplex. Infecções únicas foram detectadas em 82% das amostras e infecções múltiplas em 18% das amostras. A falha no tratamento foi quase 5 vezes maior no grupo de pacientes apresentando infecções múltiplas (57%), em comparação aos pacientes portadores de infecção única (12%) ($p = 0,005$).

A presença de múltiplos tipos virais também pode estar associada ao desenvolvimento de lesões neoplásicas na região anal em homens, podendo atuar para o desenvolvimento de câncer. Pacientes infectados pelo HIV têm um risco aumentado de infecção por HPV e lesões relacionadas, devido a resposta imunológica e às interações virais (ZEIER *et al.*, 2015).

Em um estudo, Rovelli *et al.* (2017) buscaram verificar a presença de múltiplos tipos de HPV em associação com o HPV-16 em homens HIV positivos, e se as infecções múltiplas estariam associadas a lesões escamosas intraepiteliais anais nesses indivíduos. No geral, concluiu-se que em homens infectados pelo HIV, a prevalência de achados citológicos anormais foi de 29%, e de HPVs de alto risco foi de 66%. A presença concomitante de HPV-16 e múltiplos genótipos de HPV de alto risco foi associada a um risco aumentado de achados citológicos anormais.

Resultados semelhantes foram observados, no trabalho de Cheng *et al.* (2018), que também incluíram pacientes do sexo masculino HIV positivos, com lesões anais pré-cancerosas. Foi verificado que a maioria dos pacientes que apresentaram lesões pré-neoplásicas possuíam múltiplas infecções por HPV, se comparado com os que não apresentavam lesão (93,1% *versus* 67,3%); e que a probabilidade de se desenvolver lesão aumentava com o número crescente de tipos de HPV em múltiplas infecções. Os tipos de HPV cobertos pela vacina nonavalente do HPV foram detectados em 70,1% dos pacientes deste estudo.

Destaca-se que não foram encontrados trabalhos que estudassem a influência de múltiplas infecções na persistência da infecção ou no desenvolvimento de lesões em amostras penianas.

2.3.2 Carga viral

Existem vários estudos, principalmente em mulheres, correlacionando o tipo de HPV detectado e a presença de lesões neoplásicas, além da associação entre altas cargas virais a persistência da infecção e a progressão destas lesões.

Schmeler e Sturgis (2016) relatam que a infecção persistente por HPV de alto risco é um importante fator etiológico para o câncer do colo do útero, da vagina, ânus e pênis.

Dong *et al.* (2018) propuseram avaliar a associação entre as cargas virais de HPVs de alto risco e lesões cervicais. A carga viral de 1.396 amostras positivas para DNA-HPV de alto risco foi analisada pelo método multiplex de PCR em tempo real. As cargas virais foram correlacionadas com a gravidade da lesão cervical. Altas cargas virais dos tipos do HPV-16, 31, 33, 52 e 58 foram significativamente associadas a pacientes com lesão escamosa intraepitelial de alto grau, usando uma média de ponto de corte de 4,36 cópias/10.000 células. Enquanto, para os tipos HPV-18, 45, 56 e 59, não houve significância entre a associação da carga viral e gravidade da lesão. Outros estudos também relataram que a carga viral do HPV-18 não teve correlação com o grau da lesão cervical (CONSTANDINO-WILLIAMS *et al.*, 2010; SEGONDY *et al.*, 2018; THOMSEN *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2017).

Fu Xi *et al.* (2017), buscaram determinar a associação entre a carga viral de outros tipos de HPVs oncogênicos, que não sejam os tipos HPV-16 e HPV-18 e o tipo de lesão cervical. Os resultados sugerem que o risco associado à carga viral do HPV em NIC II e NIC III é dependente do tipo, restringindo às espécies filogeneticamente relacionadas ao HPV-16.

Hong *et al.* (2017), tiveram como objetivo avaliar a patogênese do HPV-16 em sua forma epissomal em amostras de câncer cervical. Através de PCR em tempo real foi avaliado o estado físico (relação E2/E6), a carga viral e os níveis de transcrição do mRNA de E6. A frequência de metilação do promotor do HPV-16 foi detectada por PCR e pirosequenciamento. Em 93 amostras, 21,5% (20/93) apresentaram-se na forma integrada, 53,8% (50/93) na forma mista e 24,7% (23/93) na forma epissomal. A expressão média de E6 em amostras epissomais foi 7,13 vezes maior do que em genomas integrados e a carga viral em genomas epissomais foi 4,53 vezes maior do que nas formas integradas. A expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) E6 foi aumentada concomitantemente com a carga viral em casos de câncer puramente epissomais. Não houve diferenças entre as amostras em relação à metilação do promotor do HPV-16. Conclui-se que as formas epissomais do HPV-16 super-expressam mRNA de E6, provavelmente devido ao alto nível de carga viral evidenciado.

Ao contrário do exposto acima, Cheung *et al.* (2006) não encontraram diferença significativa entre as cargas virais e diferentes graus de lesões cervicais escamosas induzidas por HPV. Argumentam que a replicação viral não seria necessária para a manutenção do fenótipo canceroso.

São poucos os trabalhos que avaliaram a carga viral do HPV em amostras anogenitais em homens. A maioria deles tem investigado a carga viral em amostras anorretais de pacientes HIV positivos. Estes pacientes, frequentemente, apresentam alta carga viral, o que tem sido associada com persistência da infecção e progressão de lesões nesta população, assim como em mulheres (ALVAREZ *et al.*, 2010; BLEEKER *et al.*, 2006; SALIT *et al.*, 2009). Homens que se relacionam sexualmente com outros homens são mais susceptíveis a desenvolverem lesões anais, sendo que em indivíduos HIV positivos essas chances aumentam. Estudando indivíduos dessa população, Kreuter *et al.* (2007) encontraram uma prevalência de 81% de infecção por HPV em portadores de neoplasias intraepiteliais anais. A carga viral média foi de 92 cópias de DNA viral/cópias de β -globina. Variações entre 0,03 e 17.634 cópias de DNA viral/cópias de β -globina foram encontradas.

Em outro estudo, Utaipat *et al.* (2016) encontraram associação entre a carga viral de HPVs de alto risco e o desenvolvimento de lesões intraepiteliais anais. Neste estudo foram comparados grupos de homens HIV positivos e HIV negativos, sendo a genotipagem dos tipos virais e a carga viral realizadas pela técnica de PCR em tempo real. As cargas virais do HPV-16 e 18 aumentaram em relação à anormalidade dos diagnósticos citológicos. Maior carga viral do HPV-18 ($10^{4,23}$ cópias/5000 células) foi associada à positividade para o HIV do que em HIV negativos ($10^{0,18}$ cópias/5000 células).

Marra *et al.* (2017), procuraram verificar se havia relação entre carga viral e persistência da infecção do HPV, comparando homens HIV positivos e HIV negativos que se relacionam sexualmente com outros homens. Swabs anais foram coletados de 6 em 6 meses no período de 2010 a 2011. Foram pesquisados 25 tipos de HPV por meio da técnica de PCR; a carga viral dos vírus HPV-16 e HPV-18 foram quantificadas através de PCR em tempo real. Dos homens HIV negativos, 54 e 22 homens eram, respectivamente, positivos para HPV-16 e HPV-18. Em relação aos homens HIV positivos, 64 e 39 homens eram, respectivamente, positivos para HPV-16 e HPV-18. A média da carga viral para o HPV-16 foi de 19,6 vírus/células e para o HPV-18 foi de 8,6 vírus/células. A carga viral do HPV-16 e 18 não diferiu

significativamente entre os grupos. Porém alta carga viral do HPV-16 foi um fator determinante para a persistência da infecção.

Poucos trabalhos dedicados ao estudo da carga viral em amostras penianas foram encontrados.

Em um estudo realizado na China, Liu *et al.* (2018) tiveram como objetivo investigar a associação entre a carga viral e a persistência da infecção, em amostras genitais de homens. Foram coletados raspados do corpo, glândula, sulco coronal e escroto. Através da técnica de PCR, 18 tipos de HPV (10 de alto risco e 8 de baixo risco) foram pesquisados e a carga viral detectada através de PCR em tempo real. Os pacientes foram acompanhados por duas visitas anualmente entre 2009 e 2013. Homens com múltiplos parceiros sexuais foram 2,42 vezes mais propensos a terem níveis mais altos de carga viral de HPV de alto risco. Níveis mais altos de carga viral do HPV de alto risco em relação ao primeiro diagnóstico, conferiu (i) maior probabilidade de o indivíduo permanecer positivo para o mesmo tipo de HPV até 12 meses; e (ii) um aumento na probabilidade de infecção persistente/intermitente (vírus detectado repetidamente, com ou sem um período de negatividade intercorrente) em comparação com infecções transitórias. Através deste estudo concluiu-se que: altas cargas virais de HPV de alto risco foram associados à redução do *clearance* do HPV, levando à persistência da infecção; e que o hábito de ter múltiplos parceiros sexuais ao longo da vida está associado ao aumento da carga viral de HPVs de alto risco em amostras de raspado genital masculinos.

Senkomago *et al.* (2016), propuseram em seu trabalho avaliar a associação entre a carga viral do HPV-16 e 18 em amostras penianas, e a sua subsequente depuração em homens. A cada 6 meses, por dois anos, foram realizadas esfoliações de dois locais anatômicos (glândula e sulco coronal) para a coleta de amostras. A detecção do DNA-HPV foi realizada pelo método de PCR e a carga-viral por PCR em tempo real. Resultados acima de 250 cópias de vírus por célula foram classificados como alta carga viral, e abaixo ou igual a 250 cópias por células, como baixa carga viral. Um total de 291 amostras positivas para HPV-16 e 131 positivas para HPV-18 foram analisadas ao longo de 24 meses. A alta carga viral em comparação com baixa carga viral foi associada à redução do *clearance* do vírus HPV-16 e 18, o que pode ter gerado uma (i) maior probabilidade de desenvolvimento de lesões penianas com infecção por HPV e alta carga viral, assim como, (ii) o aumento da transmissão do HPV para suas parceiras.

São vários os trabalhos que avaliam a carga viral de HPVs de alto risco, porém poucos os que avaliam a carga viral de vírus de baixo risco, apesar de se saber que os condilomas acuminados estão fortemente associados ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer (ALVAREZ *et al.*, 2010; BENNETTS *et al.*, 2015; UTAIPAT *et al.*, 2016). Registra-se que a maior parte desses trabalhos foi realizada com amostras obtidas da população feminina.

Ball *et al.* (2011) estudaram amostras de pacientes com condiloma acuminado positivas para DNA-HPV em relação à carga viral através do método de PCR em tempo real. A prevalência dos HPVs-6/11 foi de 97% e 35% estavam infectadas pelos HPV-16 ou 18, ou por ambos. Múltiplas infecções foram determinadas em 71% das amostras, sendo 48% dos condilomas infectados por vírus de alto e baixo risco, concomitantemente. As cargas virais encontradas para os HPV-6, 11 e 16 foi 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.

Coutlée *et al.* (2009), buscaram determinar a associação entre a presença de lesão de baixo grau e a carga viral do HPV-6. Amostras de esfregaço cervical foram colhidas com *cytobrush* de 90 mulheres (67 sem lesão, 11 com lesão intraepitelial cervical de baixo grau (*low-grade squamous intraepithelial lesion* - LSIL), 5 com lesão intraepitelial cervical de alto grau (*low-grade squamous intraepithelial lesion* – HSIL), 6 com lesão de grau desconhecido e 1 com LSIL e colposcopia normal). As amostras foram analisadas quanto à presença do HPV-6, carga viral e integração através de PCR em tempo real. A carga viral do HPV-6 variou de $1,8 \times 10^2$ a $4,25 \times 10^8$ cópias por g de DNA celular. A carga viral foi maior em mulheres com LSIL, com ou sem coinfeção com tipos de HPV de alto risco, do que em mulheres sem lesão. Carga viral do HPV-6 maior que $8,76 \times 10^6$ cópias por g DNA, correspondendo à carga média de HPV-6 medida em mulheres com LSIL, foi mais frequentemente detectada nessas mulheres com LSIL do que em mulheres sem LSIL. O DNA-HPV-6 não se apresentou integrado em nenhuma das amostras, confirmando dados da literatura.

Forslund *et al.* (2016), pesquisaram a carga viral do HPV-6, o estado físico e o nível de transcrição do gene *E7*, em 25 amostras de papilomas de pacientes que sofriam de Papilomatose Respiratória Recidivante, utilizando o método de PCR

Luminex e PCR em tempo real. Como resultados os autores constataram que a carga viral do HPV-6 foi consistentemente maior no papiloma quando comparada à mucosa normal enquanto que os níveis de transcrição do gene *E7* (RNA_m) foram semelhantes em ambas.

2.3.3 Estado físico do DNA-HPV

Em células malignas, a proporção dos genes *E1* ou *E2* é modificada quando o genoma viral é integrado ao cromossomo da célula hospedeira. Ao se linearizar, o genoma do HPV, na maioria das vezes, se quebra nestes genes, sendo *E2* o principal responsável pela repressão da expressão dos genes *E6* e *E7*.

Durante a integração, Arias-Pulido *et al.* (2006) relataram uma prevalência de quebra no gene *E2* de 67,6% na região codificadora da porção aminoterminal da proteína *E2*, e de 78,4%, na região de dobradiça desse mesmo gene. Pequena é a probabilidade de quebra no gene *E1*. Cheung *et al.* (2006), relataram uma prevalência de quebra na região codificadora da porção aminoterminal da proteína *E2* em 86,5% dos casos, e em 12,2% dos casos na região de dobradiça.

Além de provocar um aumento numérico das oncoproteínas *E6* e *E7* dentro da célula, estudos demonstraram que o HPV integra, preferencialmente, em locais frágeis do genoma humano, ou nas proximidades de genes que controlam as funções celulares associadas à proliferação e maturação, como genes supressores de tumor, oncogenes, 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).

O genoma do HPV integrado tem sido encontrado de duas formas: como um único genoma integrado ou como múltiplas repetições em tandem formando um concatêmero (MCBRIDE; WARBURTON, 2017). Dois modelos foram propostos na tentativa de explicar este fenômeno. O modelo chamado de *looping* está entre os mais aceitos para descrever esses mecanismos, e explica os dois pontos de quebra no genoma do HPV encontrado nas células SiHa (AKAGI *et al.*, 2014). Este modelo indica que a integração do genoma viral é mediada pela sua replicação e recombinação com o genoma do hospedeiro, o que também explicaria a ocorrência de concatêmeros (XU *et al.*, 2015). Já Hu *et al.* (2015) propuseram outro modelo de integração, este mediado por micro-homologias nas sequências. Este modelo foi proposto com base no achado

de zonas ricas em micro-homologias, entre os sítios de integração do genoma viral com o do hospedeiro. Neste modelo, a integração do HPV ocorre durante o reparo do DNA, principalmente por meio de dois mecanismos: via FoSTeS (*Fork Stalling and Template Switching*) e MMBIR (*Microhomology-Mediated Break-Induced Replication*). O mecanismo chamado de FoSTeS envolve a integração do genoma viral durante uma parada da forquilha de replicação. No MMBIR, a replicação é induzida para quebra mediada por regiões de micro-homologia, onde o HPV se integra durante a replicação do DNA hospedeiro.

Estes mecanismos podem ser ativados durante a infecção pelo HPV a qualquer momento, em especial na presença de certos elementos genômicos locais, tais como DNA satélite, sequências repetitivas SINE (*short interspersed elements*) do tipo Alu, e sequências de micro-homologia. O vírus utilizaria as vias de Reparação do genoma do hospedeiro para fazer a integração (HU *et al.*, 2015).

Rusan *et al.* (2015) reforçam a importância da integração para o processo carcinogênico, e descrevem três pontos de relevância: 1) perda de função dos genes supressores de tumor, 2) aumento da expressão de oncogenes e 3) rearranjos inter e intra cromossômicos.

A primeira integração do HPV ao genoma humano foi descrita em 1987 em células SiHa (EL AWADY *et al.*, 1987). Estudos recentes usando sequenciamento paralelo massivo mostraram que não é necessária a quebra do gene *E2* para haver uma expressão descontrolada dos oncogenes *E6* e *E7*. Outros locais de quebra ao longo do genoma viral foram identificados, sugerindo outros mecanismos que regulam a expressão de *E2* (BHATTACHARJEE; SENGUPTA, 2006; HU *et al.*, 2015; OJESINA *et al.*, 2013).

Os genes localizados próximo aos locais de integração dos genomas virais (regiões flangeadoras) podem sofrer alterações nos níveis de expressão com efeitos, tanto positivos quanto negativos. Uma recente análise de sítios de integração relatou a presença de vários genes afetados pela integração do genoma viral. Estes apresentavam funções em vias como angiogênese, transcrição, diferenciação celular, migração, proliferação e regulação da morte celular, entre outras (ZHANG *et al.*, 2016).

A estrutura do vírus HPV pode ser modificada por enzimas do hospedeiro como as Histonas acetiltransferases (HATs) e Histonas desacetilases (HDACs), que podem permitir ou bloquear o acesso ao maquinário de transcrição, respectivamente

(KALANTARI *et al.*, 2008). Adicionalmente, DNA metiltransferases do hospedeiro são capazes de adicionar grupos metil a citosinas CpG em locais do genoma viral que podem alterar a expressão do HPV. A metilação do CpG na região *Early* do DNA do HPV16, na extremidade 3' da *Long Control Region* (3'LCR), associada à presença de formas epissômicas do genoma viral com, conseqüentemente, *E1* e *E2* intactos, bloquearia o acesso da proteína viral E2 aos locais de ligação de E2. Contudo, ainda não está claro se a metilação na região 3'LCR do DNA do HPV-16 também pode alterar outras características do tumor, além do estado físico do DNA viral (FILHO *et al.*, 2017).

Sobre o efeito da integração viral nos padrões epigenéticos, foi observado que nos estágios tardios do câncer cervical, os padrões de metilação aumentaram e esse fato foi associado ao estado físico do DNA viral (FERNANDEZ *et al.*, 2009). Padrões de metilação estão correlacionados com o número de cópias virais integradas ao genoma do hospedeiro. Foi observado diferenças significativas entre os níveis de metilação nas amostras em que o HPV está presente apenas na forma epissomal, ou se cópias únicas ou múltiplas estão integradas ao genoma do hospedeiro (CHAIWONGKOT *et al.*, 2013).

Um estudo buscou avaliar se o nível de metilação dos quatro locais CpGs do genoma do HPV-16: no local de ligação do SP1, E2BS #3 e E2BS #4, na região 3'LCR do HPV-16, poderiam estar associados com a idade do paciente e integridade de *E1* e/ou *E2*. O pirosequenciamento de DNA foi usado para medir o nível de metilação em 69 amostras de câncer cervical invasivo, obtidas de biópsias de pacientes atendidos no Instituto Nacional do Câncer (INCA). Amplificações por PCR foram realizadas para avaliar o estado de quebra dos genes *E1* e *E2* do HPV16. A média de metilação por amostra variou amplamente, de <1 a 88,00%. A presença de genes intactos *E1/E2*, a idade do paciente e o tipo de tumor (carcinomas de células escamosas ou adenocarcinomas), foram positivamente associadas à metilação média em ambas as análises. Esses achados mostraram que a presença de *E1/E2* intactos foi associada a altos níveis de metilação do DNA, e que pacientes mais velhas apresentaram níveis mais elevados de metilação do que os mais jovens (FILHO *et al.*, 2017).

Essas evidências mostram os diferentes padrões de expressão gênica entre amostras que apresentaram formas epissomais e integradas do HPV. Estes padrões alterados de expressão gênica poderiam emergir além da metilação, também

da acetilação, mutações, variações do número de cópias, entre outros, e deve ser considerado como influenciadores (ZHANG *et al.*, 2016).

Sendo assim, pode-se dizer que a integração do HPV afeta frequentemente aqueles genes que estão sendo constantemente expressos durante a transcrição e reparo do DNA, favorecendo o desenvolvimento da carcinogênese (GUO *et al.*, 2017; ROSENTHAL *et al.*, 2013; VEMULA *et al.*, 2015). Portanto, a integração do HPV é proposta como uma mutação voltada para a progressão do câncer, não sendo apenas dependente da super expressão de *E6* e *E7* apenas.

Os métodos convencionais para investigar o estado físico do genoma viral desenvolvidos antes do sequenciamento de nova geração, baseiam-se na relação *E2/E6*, devido à quebra do gene *E2* quando o vírus se integra ao genoma do hospedeiro (CHOO *et al.*, 1987; CRICCA *et al.*, 2009; HO *et al.*, 2011; KAHLA *et al.*, 2014a; TORNESELLO *et al.*, 2013). Entretanto, estudos têm mostrado que pode ocorrer a quebra no gene *E1* ou em um dos oncogenes *E6* ou *E7* (KISELEVA *et al.*, 2013, 2014; KAHLA *et al.*, 2014b; TSAKOGIANNIS *et al.*, 2015). Portanto, apesar desta metodologia fornecer sensibilidade significativa na identificação de eventos de integração viral por meio da análise da razão *E2/E6*, ela apresenta uma certa limitação considerável em relação aos eventos de integração que ocorreram através da ruptura de outros genes (TSAKOGIANNIS *et al.*, 2015).

Segundo Tsakogiannis *et al.* (2015), a técnica de PCR em tempo real utilizada para os fins de avaliação da integração é útil para diferenciar o DNA-HPV integrado do episomal, é rápida, de baixo custo, de alta sensibilidade e especificidade, não necessita de procedimentos de pós-amplificação, permite a detecção da infecção viral em todos os estágios da displasia, e é suficiente para o diagnóstico de rotina de integração do DNA-HPV. Como pontos negativos, os autores relatam a impossibilidade de se detectar o local da inserção do DNA viral, a fragilidade ao determinar os locais de ruptura do DNA-HPV, a possibilidade de gerar resultados falso-negativos para eventos de integração que ocorram em genes não utilizados como alvo.

Mesmo diante desses argumentos o modelo Razão *E2/E6* permanece sendo utilizado por vários pesquisadores na determinação do estado físico do HPV em diferentes amostras (CHEN *et al.*, 2017; CHOI *et al.*, 2018; KHANAL *et al.*, 2018; LORENZI *et al.*, 2017; MANAWAPAT-KLOPFER *et al.*, 2018; SZOSTEK *et al.*, 2017; YAMASHITA *et al.*, 2018).

São poucos os trabalhos que avaliaram a prevalência do estado físico do DNA-HPV-16 em amostras masculinas (ALVAREZ *et al.*, 2010; de LIMA ROCHA, 2013; DO *et al.*, 2012; KALANTARI *et al.*, 2008; KARBALAIE NIYA *et al.*, 2018; TORNESELLO *et al.*, 1997). Alvarez *et al.* (2010), detectaram em amostras 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 75,6% (KARBALAIE NIYA *et al.*, 2018), 90% (de LIMA ROCHA, 2013), 89% (DO *et al.*, 2012), 80% (TORNESELLO *et al.*, 1997) e, em 73%, quando a integração estava associada ou não à forma epissomal (KALANTARI *et al.*, 2008).

No trabalho de de Lima Rocha *et al.* (2013), a carga viral e a integração do HPV-16 ao genoma humano foram avaliadas pela técnica de PCR em tempo real, onde foram quantificados os genes *E2* e *E6*, em 38 amostras penianas de indivíduos com condiloma acuminado ou assintomáticos, sendo estes últimos parceiros de mulheres com lesão escamosa intraepitelial de alto grau. Esses parâmetros foram também estudados em 9 amostras de carcinoma peniano. 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, mas não o único. Neste trabalho, a integração do genoma do HPV-16 parece não ser influenciada pela presença de condiloma acuminado ou de múltiplas infecções, entretanto cabe ressaltar o pequeno número de amostras analisadas.

Karbalaie Niya *et al.* (2018), tiveram como objetivo avaliar o estado físico do DNA-HPV-16 em quatro dos principais cânceres relacionados ao HPV: câncer de cabeça e pescoço (n=156), colo retal (n=66), peniano (n=14) e cervical (n=436). O DNA foi extraído de 672 amostras parafinadas. O método utilizado para detecção do HPV foi a genotipagem por INNOLipa HPV e sequenciamento por PCR. Foram incluídos na pesquisa os pacientes positivos para HPV-16, e em múltipla infecção com outros tipos virais. O método de PCR em tempo real foi utilizado para detecção da integração, onde foram quantificados os genes *E2* e *E7*. Foram selecionadas para análise da integração, com base no estado clínico e disponibilidade das amostras, 45 casos, sendo que 11 (24,4%) encontraram-se na forma epissomal, 16 (35,6%) integrada e 18 (40%) na forma mista. O estudo mostrou que houve uma associação significativa entre a integração do HPV-16 e as lesões cancerosas em estágio mais

avançado, onde foi encontrada maior frequência de integração (69,2%) em lesões de alto grau em amostras cervicais, se comparado com outros tipos de lesões. Nas amostras penianas, obteve-se resultado significativo apenas na correlação entre a forma episomal e lesão de alto grau. No total foram analisadas 11 amostras de lesões penianas, onde 6 (54%) apresentaram positividade para o HPV-16, sendo que 1 (17%) com lesão de alto grau se apresentou na forma integrada, 3 (50%) na forma episomal, todas essas lesões de alto grau e 2 (33%) na forma mista, sendo uma lesão de alto grau e outra de baixo grau. O trabalho mostrou que a forma episomal é mais comum em amostras penianas com lesão de alto grau, sugerindo que pode haver uma menor instabilidade cromossômica ou menor frequência de integração do HPV em amostras masculinas, quando comparadas a pacientes com alterações neoplásicas do colo do útero.

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, 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 na forma 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 sugeriram que o carcinoma peniano pode apresentar parâmetros etiológicos e epidemiológicos similares ao do colo uterino HPV-dependente. Este estudo demonstrou 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) 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 $E2$ do gene $E6$. Múltiplas infecções foram encontradas em 96,3% destas amostras e foram associadas a Neoplasias intraepiteliais anais (NIA) 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 episomal, 3,3% na forma mista e 1,4% integrada. A quantidade de HPV-16 na forma episomal foi associada com NIA de alto grau. 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 NIA, 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 apresentaram o DNA-HPV-16 na forma integrada. Neste trabalho, o fumo foi associado às lesões de alto grau.

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% com a 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, 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 carga viral.

2.4 Diagnóstico da infecção por HPV e de sua neoplasia associada

Vários testes moleculares encontram-se disponíveis para determinar a presença da infecção pelo HPV em diferentes amostras. Dentre eles, os mais utilizados são a PCR e a Captura híbrida. Entretanto, tais testes são apenas utilizados na clínica no contexto de rastreamento ou acompanhamento de citologia ou histologia de lesões cervicais. Não há recomendações para sua utilização no acompanhamento de parceiros masculinos de mulheres com HPV ou mulheres com < 25 anos, no

diagnóstico de verrugas genitais ou como um teste geral de IST (WORKOWSKI; BOLAN, 2015).

A aplicação de ácido acético a 3% a 5% tem sido utilizada por alguns médicos no exame de peniscopia com a finalidade de identificar as lesões aceto-brancas, áreas possivelmente acometidas pela infecção por HPV, e para direcionar a coleta de biópsias. Entretanto, a utilização deste método para o rastreamento de lesões em homens não é recomendada, devido à baixa especificidade e à alta prevalência de resultados falsos negativos das biópsias. Além disso, o resultado destes exames não interfere no manejo clínico (WORKOWSKI; BOLAN, 2015).

O rastreamento de lesões intraepiteliais do pênis, utilizando a citologia, também não é indicado. Em homens, alterações citológicas decorrentes da infecção pelo HPV, apesar de similares às que ocorrem nas mulheres (coilocitose, disceratose e alterações nucleares), são menos frequentes, o que torna o diagnóstico pouco sensível. Alguns trabalhos demonstram que a ocorrência de coilócitos em amostras penianas é de apenas 4-5% e outros fatores como pequena quantidade de células, a baixa aderência das mesmas à lâmina e a sua frequente queratinização (presença de numerosas escamas córneas) dificultam ainda mais o diagnóstico citológico (BOON *et al.*, 1988; de LIMA ROCHA *et al.*, 2008; FERENCZY, 1995; NICOLAU *et al.*, 1997).

Devido à todas estas limitações, o rastreamento de lesões pré-malignas do pênis não é realizado, o que torna o diagnóstico tardio e o tratamento agressivo. Neste contexto, a busca por novos marcadores de diagnóstico precoce para lesões malignas do pênis se torna essencial.

3 JUSTIFICATIVA

Por meio desta revisão, pode-se observar que, apesar de raro, o estudo do câncer peniano não pode ser considerado de menor importância, devido a inexistência de métodos de triagem para o diagnóstico precoce do câncer peniano. Vale ressaltar que a incidência deste tumor, no Brasil, é uma das maiores no mundo (PARKIN *et al.*, 2008). Sendo também, por isso, de grande importância, a avaliação do risco de desenvolvimento de lesões neoplásicas em pacientes com condiloma acuminado peniano, a lesão mais frequente provocada pelo HPV na população masculina.

Poucos estudos foram desenvolvidos com objetivo de verificar o papel do HPV na carcinogênese peniana e mais raros ainda são os estudos envolvendo múltiplas infecções. Acredita-se que estas possam dificultar o surgimento de uma resposta imune eficaz, favorecendo a persistência da infecção e o aumento da carga viral e da integração, o que acarretaria no desenvolvimento e no agravamento das lesões. Estudos avaliando a carga viral, principalmente em relação aos vírus de baixo risco, são raros. Estudos sobre o estado físico do DNA-HPV em lesões penianas também.

Diante dessas considerações, este estudo se justifica ao tentar compreender a influência das múltiplas infecções, o comportamento da carga viral quando em múltipla infecção e sua importância na carcinogênese peniana, além de avaliar a integração do DNA-HPV-16 nas amostras de câncer e condiloma acuminado penianos. Visa acrescentar informações a uma literatura escassa e vislumbrar uma possível utilização destes marcadores no diagnóstico precoce do câncer peniano.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a presença e a carga viral do HPV-6/11 e HPV-16 e o estado físico do HPV-16 em amostras de condiloma acuminado e carcinoma penianos.

4.2 Objetivos Específicos

- Análise histopatológica das amostras de câncer e de condiloma acuminado, a fim de classificá-las e verificar se há algum grau de displasia em amostras de condiloma acuminado;
- Avaliar a presença dos vírus HPV-6/11 e HPV-16 em amostras de condiloma acuminado e câncer peniano;
- Avaliar a carga viral dos vírus HPV-6/11 e HPV-16 em amostras de condiloma acuminado e câncer peniano;
- Avaliar o estado físico do genoma do HPV-16 em amostras de condiloma acuminado e câncer peniano;
- Comparar a carga viral do HPV-6/11 e HPV-16, de forma isolada e em múltipla infecção, nas amostras de condiloma acuminado e câncer peniano, correlacionando aos achados histológicos;
- Comparar o estado físico do genoma do HPV-16, de forma isolada e em múltipla infecção, nas amostras de condiloma acuminado e câncer peniano, correlacionando com a carga viral e aos achados histológicos.

5 METODOLOGIA

5.1 População Estudada

Fizeram parte desse estudo 109 amostras incluídas em parafina, sendo 86 amostras de condiloma acuminado e 23 de câncer peniano de pacientes que foram submetidos à remoção cirúrgica. Estas amostras foram cedidas pelos seguintes laboratórios de Anatomia Patológica de Belo Horizonte – Minas Gerais: Laboratório Tafuri (73 amostras), Laboratório Citodiagnóstico (16 amostras) e Laboratório do Hospital Luxemburgo (20 amostras), aos quais foi enviada uma Carta Convite de Participação no Projeto de Pesquisa (Anexo A). Após o aceite, os laboratórios assinaram uma Carta de Aceite de Participação no Projeto de Pesquisa (Anexo B).

Os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes doadores das amostras são restritos, consistindo apenas do diagnóstico laboratorial da lesão e idade do paciente.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e registrado com o número 73908117.9.0000.5149 (Anexo C).

5.2 Análise Histopatológica

Os cortes histológicos corados por H&E (hematoxilina e eosina) foram examinados ao microscópio óptico no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG com o propósito de confirmar a presença das lesões alvo nas amostras. Essas lesões foram classificadas de acordo com critérios descritos estabelecidos na literatura médica (CHAN, 2018; CUBILLA *et al.*, 2018).

5.3 Análise molecular

5.3.1 Desparafinização da amostra e extração de ácidos nucleicos

Cinco cortes de 10 µm obtidos de cada amostra (condiloma acuminado e câncer peniano) foram colocados em tubos eppendorffs de 1,5 mL previamente autoclavados para eliminação de interferentes e identificados. O micrótomo

(MICROM, modelo HM315R) e a navalha foram cuidadosamente limpos com xilol, etanol e solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, nesta ordem, entre a coleta de amostras distintas para prevenir a contaminação cruzada (WRIGHT & MANOS, 1990).

Para a extração do DNA das amostras parafinadas, foi utilizado o protocolo de extração descrito por Wright & Manos (1990), com algumas modificações feitas pelo Laboratório de Patogênese Molecular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Para a etapa de remoção da parafina, os cortes foram imersos em 1 mL de xilol, aquecido a 65°C, sob rotação em homogeneizador (PROENIX®, modelo AP 22), por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas (centrífuga B. BRAUN SIGMA®, modelo 2K15) a 5000 rpm por 2 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado. Este processo foi repetido duas vezes. Em seguida, os fragmentos desparafinizados foram lavados 2 vezes em álcool etílico absoluto, com consecutiva centrifugação (centrífuga B. BRAUN SIGMA®, modelo 2K15) a 10.000 rpm por 2 minutos e desprezo do sobrenadante. Este procedimento foi repetido com álcool etílico a 95% e reidratado com álcool etílico 70%. Estas etapas de lavagem do material são importantes para a retirada de todo xilol, pois este inativa a proteinase K, utilizada na etapa seguinte para digestão das proteínas. Finalmente, foi realizada a lise do tecido com 500 µL de solução de digestão preparada no Laboratório de Patogênese Molecular do Departamento de Morfologia do ICB - UFMG e 5 µL de proteinase K (10 mg/mL), pela incubação em banho-maria (FANEM®, modelo 32683) a 56°C por cerca de 3 a 5 dias. Após a digestão completa do tecido, os tubos com as amostras foram incubados a 95°C, durante 10 minutos, para inativação completa da proteinase K e outras proteínas. Assim, obteve-se o que denominamos a amostra na forma de "lisado".

A seguir, para purificação do DNA, com o lisado em temperatura ambiente, foi adicionado 300 µL de solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (na proporção de volume de 25:24:1) a cada tudo, homogeneizados por 20 segundos e submetidos à centrifugação (centrífuga B. BRAUN SIGMA®, modelo 2K15) a 10.000 rpm por 3 minutos para a precipitação das proteínas. Em seguida, o sobrenadante contendo o material genético foi transferido para um novo tubo eppendorff de 1,5 mL. Esse processo foi repetido adicionando-se ao sobrenadante obtido, 300 µL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (na proporção de volume de 24:1), com posterior homogeneização e centrifugação (centrífuga B. BRAUN SIGMA®, modelo 2K15) dos tubos para a precipitação de proteínas residuais. Em seguida o volume de

sobrenadante foi medido e adicionado em uma proporção de 3 vezes a quantidade de álcool absoluto e 1/10 do volume de solução de acetato de sódio 3M. Agitou-se suavemente os tubos, e esses foram colocados *overnight* em freezer vertical a -20°C (Eletrolux® modelo FE26). Posteriormente, foram centrifugados (centrífuga B. BRAUN SIGMA®, modelo 2K15) a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado. O precipitado contendo o DNA purificado foi ressuspensionado em 100 µL de água bidestilada estéril, e as amostras de DNA obtidas foram estocadas em freezer vertical -20°C (Eletrolux® modelo FE26) até o momento de uso. Assim obteve-se o que chamamos de “DNA purificado”.

As amostras na forma de lisado e DNA purificado foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop ND-Lite (Thermo Scientific®), com o objetivo de verificar e comparar a concentração e a pureza do DNA extraído. As amostras na forma de lisado e DNA purificado também foram testadas na PCR convencional e na PCR em tempo real, sendo avaliadas em qual dessas formas de extração teria uma melhor eficiência na amplificação do DNA e melhor índice de positividade.

5.3.2 Amplificação do gene de β -globina, identificação da infecção por HPV e tipagem

Após a extração, a concentração e a pureza do DNA foram avaliadas pelo espectrofotômetro Nanodrop ND-Lite (Thermo Scientific®). O esperado é que as amostras apresentem uma taxa de pureza (absorbância de 260/280 nm) entre 1,8 e 2.

Foram utilizados os métodos de identificação e tipagem do HPV de acordo com técnicas já padronizadas no Laboratório de Patogênese Molecular do Departamento de Morfologia do ICB - UFMG, e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia - UFMG.

Durante o processamento dos tecidos, após a excisão cirúrgica, os mesmos foram fixados em formaldeído. A fixação de tecidos com este reagente provoca o *crosslink* de vários componentes e a fragmentação de ácidos nucleicos. Os fragmentos de DNA resultantes apresentam, em média, de 300 a 400 pares de base (pb) e os fragmentos de RNA em torno de 200 pb (ALVAREZ-ALDANA; MARTÍNEZ; SEPÚLVEDA-ARIAS, 2015; LEHMANN & KREIPE, 2001). Conseqüentemente, a

eficiência dos primers de PCR que geram um produto pequeno é consideravelmente maior do que os conjuntos de primers que produzem produtos maiores (KLETER *et al.*, 1998). Por este motivo, foram utilizados oligonucleotídeos capazes de amplificar fragmentos menores. Adicionalmente, com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica de PCR, utilizou-se como metodologia protocolos do tipo PCR-*nested* e *hemi-nested*-PCR nas quais, o segmento genômico é amplificado primeiro de forma abrangente, e depois, utilizando este primeiro produto em uma segunda reação de PCR, ocorre a amplificação da real sequência-alvo. As técnicas de PCR-*nested* provaram ser mais sensíveis para a detecção de HPV do que os métodos de PCR baseados em apenas uma reação de amplificação (CHAIWONGKOT *et al.*, 2007; WINDER *et al.*, 2009).

A análise molecular foi realizada a partir de uma alíquota retirada da amostra de DNA isolado. Inicialmente foi realizada a PCR para amplificação do fragmento do gene da β -globina, que funciona como controle da integridade da amostra, uma vez que permite verificar indiretamente a integridade do DNA extraído. Posteriormente foram feitas a pesquisa do DNA-HPV e a identificação dos HPVs tipos 6/11 e 16. Os testes foram iniciados com uma alíquota de 2 μ L do DNA extraído. Caso a amplificação fosse negativa, a quantidade de DNA seria ajustada. Foram testados os volumes de 1 e 3 μ L da amostra original e 3 μ L de uma diluição de 1:10. Não havendo positividade nessas tentativas, a amostra foi considerada negativa para o HPV.

As reações de PCR foram realizadas em termocicladores (Applied Biosystems®, modelo 2720). As etapas de extração do DNA, preparo da solução com os reagentes da reação de PCR, adição do DNA à solução de reagentes e eletroforese foram realizadas em ambientes diferentes para evitar contaminação. Em todas as reações de PCR foram incluídos controles positivos (amostras sabidamente positivas obtidas no próprio laboratório por testes aleatórios) e branco da reação (tubo que continha todos os reagentes da PCR, exceto o DNA). Os produtos da PCR, juntamente com o padrão de peso molecular, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e impregnados pelo nitrato de prata.

Após a tipagem, as amostras de condiloma acuminado e câncer penianos infectadas pelos vírus HPV-6/11 e/ou HPV-16 foram encaminhadas para os testes de carga viral do HPV-6/11 e/ou HPV-16 e integração do DNA-HPV-16.

5.3.2.1 Amplificação do gene β -globina

Para verificação da integridade do DNA extraído de cada amostra, foram utilizados em uma primeira reação de PCR os oligonucleotídeos GH20 (5'-GAAGAG CCAAGGACAGGTAC-3') e PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') (SAIKI *et al.*, 1988). Em seguida, os produtos da primeira reação foram submetidos a uma segunda reação com os oligonucleotídeos PC03 (5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3') e PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') (SAIKI *et al.*, 1988). As condições de preparo da reação de PCR e o programa de amplificação utilizado estão descritos nos Quadros 2, 3 e 4.

Quadro 2 - Componentes da reação de PCR para amplificação do gene β -globina (268 pb)

Reagentes	Concentração	Concentração / tubo	Volume / tubo
GH20 (Eurofins®)	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
PC04 (IDT®)	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
Tampão IB (phoneutria®)	10x	1x	1 μ l
dNTP Mix (Bio-Rad®)	2,5 mM	200 μ M	0,8 μ l
Taq DNA pol. (phoneutria®)	5 UI/ μ l	1UI	0,2 μ l
H ₂ O	-	-	8 μ l
Volume final de 14 microlitros: 12 μ l de MIX + 2 μ l de DNA (407 ng/ μ l) da amostra			

Quadro 3 - Componentes da reação de PCR, amplificação do gene β -globina (110 pb)

Reagentes	Concentração	Concentração / tubo	Volume / tubo
PC03 (IDT ®)	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
PC04 (IDT ®)	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
Tampão IB (phoneutria®)	10x	1x	1 μ l
dNTP Mix (Bio-Rad®)	2,5 mM	200 μ M	0,8 μ l
Taq DNA pol. (phoneutria®)	5 UI/ μ l	1UI	0,2 μ l
H ₂ O	-	-	6 μ l
Volume final de 12 microlitros: 10 μ l de MIX + 2 μ l do produto da 1ª reação de amplificação de 268 pb.			

Quadro 4 - Programa de amplificação do gene β -globina (268 e 110 pb)

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	5 minutos
2	94°C	1 minuto
3	55°C	1 minuto
4	72°C	1 minuto
5	39 vezes ao passo de 2 ao 4	-
6	72°C	10 minutos
7	4°C	10 minutos
8	FIM	

5.3.2.2 Determinação da infecção por HPV

As amostras de DNA que tiveram a sua integridade confirmada através da prévia amplificação do gene de β -globina foram submetidas a PCR com os oligonucleotídeos genéricos para o HPV: MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') e MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'), capazes de amplificar um fragmento de 450 pb do gene L1 de diversos tipos de HPV (MANOS *et al.*, 1989).

As condições de preparo da reação de PCR e o programa de amplificação utilizado estão descritos nos Quadros 5 e 6.

Quadro 5 - Componentes da reação de PCR para amplificação de um fragmento de 450 pb do genoma viral

Reagentes	Concentração	Concentração / tubo	Volume/tubo
MY09 (IDT ®)	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
MY11 (IDT ®)	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
Tampão IB (phoneutria®)	10x	1x	1 μ l
dNTP Mix (Bio-Rad®)	2,5 mM	200 μ M	0,8 μ l
Taq DNA pol. (phoneutria®)	5 UI/ μ l	1UI	0,2 μ l
H ₂ O	-	-	6 μ l
Volume final de 13 microlitros: 10 μ l de MIX + 3 μ l de DNA (407 ng/ μ l) da amostra.			

Quadro 6 - Programa de amplificação do fragmento de 450 pb do genoma viral

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	4 minutos
2	55°C	1 minuto
3	72°C	2 minutos
4	95°C	1 minuto
5	39 vezes ao passo de 2 ao 4	
6	55°C	1 minuto
7	72°C	5 minutos
8	4°C	10 minutos
9	FIM	

Com o objetivo de aumentar a chance de detecção do DNA-HPV nas amostras sob análise, os produtos da reação descrita no Quadro 5, foram submetidos a PCR com os oligonucleotídeos genéricos para os HPVs: GP5+ (5'-TTTGTTACT GTGGTAGATACTAC-3') e GP6+ (5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3') (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995), capazes de amplificar um fragmento de 150 pb do gene *L1* de diversos tipos de HPV. As condições de preparo da reação de PCR e o programa de amplificação utilizado estão descritos nos Quadros 7 e 8.

Quadro 7 - Componentes da reação de PCR para amplificação de um fragmento de 150 pb do genoma viral

Reagentes	Concentração	Concentração / tubo	Volume / tubo
GP5+ (IDT ®)	10 pmol/µl	10 pmol	1 µl
GP6+ (IDT ®)	10 pmol/µl	10 pmol	1 µl
Tampão IB (phoneutria®)	10x	1x	1 µl
dNTP Mix (Bio-Rad®)	2,5 mM	200 µM	0,8 µl
<i>Taq</i> DNA pol. (phoneutria®)	5 UI/µl	1UI	0,2 µl
H ₂ O	-	-	6 µl
Volume final de 12 microlitros: 10 µl de MIX + 2 µl do produto da 1ª reação de amplificação de 450 pb.			

Quadro 8 – Programa de amplificação do fragmento de 150 pb do genoma viral

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	4 minutos
2	95°C	1 minuto
3	45°C	1 minuto
4	72°C	1 minuto
5	39 vezes ao passo de 2 ao 4	
6	72°C	1 minuto
7	4°C	10 minutos
8	FIM	

5.3.2.3 Tipagem do HPV-16

Para a detecção do DNA do HPV-16 nas amostras de DNA isoladas em nosso estudo, empregou-se um protocolo de *hemi-nested* PCR utilizando-se os iniciadores descritos por Yamaguchi *et al.* (2002). No estudo desenvolvido por esses autores não havia sido descrita a técnica de *hemi-nested* PCR, mas observamos que os autores descreveram a utilização de iniciadores capazes de amplificar um fragmento genérico da região dos genes *E6* e *E7* do HPV com os iniciadores E7CR3 (5'-TGAGCTGTCGCTTAATTGCTC-3') e E6CF4 (5'-ATTCTGTGTATGGAGAAACAT TAGAA-3'). Descreveram ainda, que fragmentos tipo-específicos de HPV eram amplificados por meio de reações de PCR independentes, utilizando-se o primer reverso E7CR3 e os iniciadores diretos (16SF1, 18SF2, 31SF1 e 52SF2), para amplificação específica dos HPVs 16, 18, 31 e 52, respectivamente.

Dessa forma, foi padronizado em estudo prévio desenvolvido no Laboratório de Patogênese Molecular do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG, o protocolo de *hemi-nested* PCR utilizado em nosso estudo para a detecção do DNA-HPV-16, protocolo baseado na utilização dos iniciadores E7CR3 e E6CF4 para a amplificação de um fragmento genérico de 306 a 343 pb dos genes *E6* e *E7*, utilizado posteriormente em uma segunda reação de PCR com os iniciadores E7CR3 (5'-TGA GCTGTCGCTTAATTGCTC-3') e 16SF (5'-TGTATGTCTTGTTCAGATCATCA-3') (YAMAGUCHI *et al.*, 2002), para detecção do fragmento de 149 pb do genoma do

HPV-16. As condições de preparo da reação de PCR e o programa de amplificação utilizado estão descritos nos Quadros 9, 10 e 11.

Quadro 9 - Componentes da reação de PCR para amplificação de um fragmento que varia de 306 a 343 pb do genoma viral

Reagentes	Concentração	Concentração / tubo	Volume / tubo
E6CF4 (Eurofins®)	10 pmol/μl	10 pmol	1 μl
E7CR3 (Eurofins®)	10 pmol/μl	10 pmol	1 μl
Tampão IB (phoneutria®)	10x	1x	1 μl
dNTP Mix (Bio-Rad®)	2,5 mM	200 μM	0,8 μl
<i>Taq</i> DNA pol. (phoneutria®)	5 UI/μl	1UI	0,2 μl
H ₂ O	-	-	6,0 μl
Volume final de 14 microlitros: 12 μl de MIX + 2 μl de DNA (407 ng/μl)			

Quadro 10 - Componentes da reação de PCR para amplificação de um fragmento de 149 pb do genoma viral

Reagentes	Concentração	Concentração / tubo	Volume/tubo
16SF (Eurofins®)	10 pmol/μl	10 pmol	1 μl
E7CR3 (Eurofins®)	10 pmol/μl	10 pmol	1 μl
Tampão IB (phoneutria®)	10x	1x	1 μl
dNTP Mix (Bio-Rad®)	2,5 mM	200 μM	0,8 μl
<i>Taq</i> DNA pol. (phoneutria®)	5 UI/μl	1UI	0,2 μl
H ₂ O	-	-	6 μl
Volume final de 12 microlitros: 10 μl de MIX + 2 μl do produto da 1ª reação			

Quadro 11 – Programa de amplificação dos fragmentos virais representados nos Quadros 9 e 10

Passo	Temperatura	Tempo
1	95 °C	5 minutos
2	54 °C	1 minuto
3	72 °C	1 minuto
4	95 °C	1 minuto
5	39 vezes ao passo de 2 ao 4	
6	54 °C	1 minuto
7	72 °C	10 minutos
8	4 °C	10 minutos
9	FIM	

5.3.2.4 Tipagem do HPV-6/11

A tipagem do HPV 6/11 foi realizada baseada em um protocolo utilizado no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os oligonucleotídeos utilizados HPV-6/11 senso (5'-TACACTGCTGGACAACATGC-3') e HPV-6/11 antisenso (5'-GTGCGCAGATGGGACACAC-3') foram descritos por Grce *et al.* (1997). As condições de preparo da reação de PCR e o Programa de Amplificação utilizado estão descritos nos Quadros 12 e 13.

Quadro 12 - Componentes da reação de PCR para amplificação de um fragmento de 301 pb

Reagentes	Concentração	Concentração / tubo	Volume / tubo
HPV-6/11 senso (IDT ®)	10 pmol/µl	10 pmol	0,25 µl
HPV-6/11 antisenso (IDT ®)	10 pmol/µl	10 pmol	0,25 µl
Tampão IB (phoneutria®)	10x	1x	1 µl
dNTP Mix (Bio-Rad®)	2,5 mM	200 µM	0,8 µl
Taq DNA pol. (phoneutria®)	5 UI/µl	1UI	0,2 µl
H ₂ O	-	-	6,50 µl
Volume final de 10 microlitros: 9 µl de MIX + 1 µl de DNA (407 ng/µl)			

Quadro 13 – Programa de amplificação do fragmento de 301 pb do genoma viral

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	5 minutos
2	94°C	30 segundos
3	68°C	30 segundos
4	72°C	1 minuto
5	4 vezes ao passo de 2 a 4	
6	94°C	30 segundos
7	65°C	30 segundos
8	72°C	1 minuto
9	34 vezes ao passo de 6 a 8	
10	72°C	5 minutos
11	4°C	10 minutos
12	FIM	

5.3.3 Determinação da carga viral dos vírus HPV-6/11 e HPV-16, e estado físico do DNA-HPV-16

Após a tipagem, as amostras de condiloma acuminado peniano contendo apenas os HPVs-6/11, ou em múltipla infecção pelos vírus HPV-6/11 e HPV-16, e as amostras de câncer peniano infectadas apenas por HPV-16 e em múltipla infecção por HPV-16 e HPV-6/11 foram identificadas e encaminhadas para os testes de carga viral e determinação do estado físico do DNA-HPV-16.

5.3.3.1 Plasmídeos pE6, pHPV-16, pHPV-11, pHPV-6 e célula SiHa

Para a análise de carga viral e integração foram utilizados plasmídeos para a construção de curvas padrão.

Os plasmídeos pHPV-6 e pHPV-11 contendo, respectivamente, os genomas completos dos HPVs-6 e 11 foram gentilmente cedidos pela Dra. Jaqueline Germano de Oliveira, do Centro de Pesquisa Renée Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e utilizados na determinação das cargas virais destes HPVs.

Foi realizado o repique dos clones bacterianos transformados com os respectivos plasmídeos e bactérias *Escherichia coli* TOP 10 competentes, preparados no Centro de Pesquisa Renée Rachou – Fiocruz. Os clones foram descongelados, posteriormente 20 µL dos mesmos foram adicionados em tubos contendo cada um, 10 mL de meio LB (Luria-Bertani) com 10 µL de ampicilina (10 µg/µL) e incubados a 37°C, *overnight* sob agitação a 200 rpm. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit de purificação de DNA plasmidial (Wizard® Plus SV Minipreps DNA purif Sytem, Promega, EUA) e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop ND-Lite (Thermo Scientific®). Uma PCR de colônia foi realizada, utilizando-se os iniciadores específicos para o HPV-6/11 descritos no Quadro 15 para a confirmação da presença do plasmídeo contendo a sequência completa do HPV-6/11 no interior da bactéria.

O pE6, plasmídeo contendo fragmento de 614 bp do gene E6 do HPV-16, da janela de leitura (*open reading frame* - ORF) nucleotídeos 22 a 617; número de acesso no GenBank, K02718) foi obtido por estudo anterior (de LIMA ROCHA, 2013), e utilizado na quantificação da carga viral do HPV-16 e de E6 necessária para a obtenção da relação E2/E6 utilizada na avaliação do estado físico do DNA-HPV-16.

O plasmídeo pHPV-16 contendo o genoma completo do HPV-16 foi gentilmente cedido pela Dr^a. Alison McBride (DNA Tumor Virus Section - *Laboratory of Viral Diseases* NIAID - National Institute of Allergy and Infectious Diseases - National Institutes of Health - Bethesda – EUA), também obtido por estudo anterior (de LIMA ROCHA, 2013). Esse plasmídeo foi utilizado na quantificação do gene E2 necessária para a obtenção da relação E2/E6 utilizada na avaliação do estado físico do DNA-HPV-16.

Células SiHa (fibroblasto humano infectado com HPV-16 na forma integrada), doadas pela professora Dra. Luisa Lina Villa, chefe do grupo de virologia do Instituto Ludwig para pesquisa do Câncer do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo, Brasil, foram cultivadas em meio Dulbecco modificado, em estufa com atmosfera de 5% CO₂, a 37°C. O DNA dessas células foi extraído e quantificado em equipamento Nanoview (G&E, EUA) em estudo prévio por de Lima Rocha (2013). Esse DNA foi utilizado como controle positivo nas PCRs convencionais de β-globina, HPV geral e HPV-16 e na construção de curvas padrão para a quantificação do gene de β-actina utilizado como gene endógeno na determinação de carga viral.

5.3.3.2 Determinação da carga viral do HPV-16

Para a determinação da carga viral foi utilizada a metodologia de PCR em tempo real em termociclador Applied Biosystems® StepOne® Real-Time PCR System, baseada na utilização do corante fluorescente Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), onde a eficiência de reação aceitável foi de 90 a 110%. O gene E6 foi quantificado utilizando curva padrão construída com diluições sequenciais de 10^7 a 10 cópias do plasmídeo pE6 e os iniciadores descritos por Cricca *et al.* (2007) (Quadro 14).

Para a determinação da quantidade de células presentes em cada reação foi realizada a quantificação do gene de β -actina (gene endógeno), conforme padronizado pelo Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, em estudo desenvolvido por de Lima Rocha *et al.* (2013), utilizando os iniciadores descritos em Wang-Johanning *et al.* (2002) (Quadro 14). Diluições sequenciais de 10^2 a 10^{-2} ng de DNA celular (DNA de células SiHa) foram preparadas para a construção da curva padrão.

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

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

Quadro 14– Iniciadores utilizados na determinação da carga viral do HPV-16

Iniciadores (Tamanho do fragmento amplificado)	Sequência
β-actina senso (Eurofins®) β-actina antisenso (Eurofins®) (295 pb)	5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3' 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'
E6 senso (IDT®) E6 antisenso (IDT®) (130 pb)	5'-AAAGCCACTGTGTCCTGAAGA-3' 5'-CTGGGTTTCTCTACGTGTTCT-3'

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* (vs) 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® StepOne® Real-Time PCR System.

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).

As condições adequadas para a realização desta análise foram testadas e adequadas de acordo com os reagentes utilizados e encontram-se descritas nos resultados.

5.3.3.3 Determinação da carga viral dos HPVs-6/11

Para a determinação da carga viral dos HPVs-6/11 foi padronizada metodologia de PCR em tempo real em termociclador Applied Biosystems® StepOne® Real-Time PCR System, baseada na utilização do corante fluorescente Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), onde a eficiência de reação aceitável foi de 90 a 110%. Nesta quantificação, foram utilizados os iniciadores tipo-específicos HPV-6/11 descritos por Grce *et al.* (1997) (Quadro 15). Estes iniciadores detectam, concomitantemente, os dois vírus.

Quadro 15 – Iniciadores testados na padronização da PCR em tempo real para determinação da carga viral do HPV-6 e 11

Iniciadores (Tamanho do fragmento amplificado)	Sequência
<p>HPV-6/11 senso (IDT®) HPV-6/11 antisenso (IDT®) (301 pbs)</p>	<p>5'-TACACTGCTGGACAACATGC-3' 5'-GTGCGCAGATGGGACACAC-3'</p>

Para tal, foram construídas duas curvas padrão: a primeira contendo apenas o plasmídeo pHPV-6 e outra apenas o plasmídeo pHPV-11. O objetivo deste experimento foi testar a eficiência de detecção dos oligonucleotídeos utilizados frente aos diferentes plasmídeos e avaliar a capacidade de quantificação perante a infecção por apenas um tipo viral (ou HPV-6 ou HPV-11). Após a padronização, uma das curvas foi escolhida para os experimentos subsequentes (ver resultados).

Foram construídas curvas padrão com diluições sequenciais de 10^7 a 10^0 cópias do plasmídeo pHPV-6 e pHPV-11.

Para a determinação da quantidade de células presentes em cada reação foi realizada a quantificação do gene de β -actina humana (gene endógeno) conforme descrito no item 4.3.3.2. A determinação da carga viral também se encontra descrita neste item.

As condições de realização desta PCR em tempo real foram padronizadas e encontram-se descritas nos resultados.

5.3.3.4 Determinação do estado físico do DNA-HPV-16 (razão E2/E6)

Com o objetivo de avaliar o estado físico do DNA-HPV-16 em relação à célula hospedeira (integrado e/ou sob forma epissomal) foi determinada a relação E2/E6, conforme descrito em Cricca *et al.* (2007) e padronizado no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG em estudo desenvolvido por de Lima Rocha *et al.* (2013).

As condições adequadas para a realização desta análise foram testadas e adequadas de acordo com os reagentes utilizados e encontram-se descritas nos resultados.

Para a determinação desta relação, o gene *E6* foi quantificado por amplificação em região específica por PCR em tempo real em termociclador Applied Biosystems® StepOne® Real-Time PCR System, baseada na utilização do corante fluorescente Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), onde a eficiência de reação aceitável foi acima de 90 a 110%. O gene *E2* foi quantificado nas mesmas condições acima, sendo amplificado na região de dobradiça que corresponde a 78,4% das quebras ocorridas nesse gene (ARIAS-PULIDO *et al.*, 2006), o par de iniciadores utilizados nessa reação foram descritos por Gravitt *et al.* (2003) (Quadro 16). Nos casos onde a integração do DNA-HPV-16 ao genoma do hospedeiro não foi detectada, ou seja, onde *E2* encontra-se íntegro, outro par de iniciadores, descritos por Arias-Pulido *et al.* (2006), foi utilizado. Nesse caso, a amplificação ocorre na região codificante da extremidade aminoterminal da proteína *E2*. O uso desse segundo par de iniciadores aumenta a sensibilidade do teste, reduzindo o erro da não determinação da integração de 16% para 5% (ARIAS-PULIDO *et al.*, 2006) (Quadro 16). Curvas padrão foram estabelecidas pela amplificação e quantificação do gene *E6* e *E2* utilizando-se, respectivamente, plasmídeo pE6 e pHPV-16. Para tal foram preparadas curvas de amplificação com diluições sequenciais de 10^7 a 10 cópias dos plasmídeos.

Quadro 16 – Iniciadores utilizados na determinação do estado físico do HPV-16, região alvo gene E2

Iniciadores (Tamanho do fragmento amplificado)	Sequência
E2 senso (Sigma®) E2 antisenso (Sigma®) Região de dobradiça (184 pb)	5'-TTTAGCAGCAACGAAGTATCC-3' 5'-AGTCTCTGTGCAACAACCTTAG-3'
E2 senso (Sigma®) E2 antisenso (Sigma®) Região aminoterminal (281 pb)	5'-GTGTGTCAGGACAAAATACTAACA-3' 5'-AAATACACTTCAAGGCTAACGTC-3'

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 conforme descrito por de Lima Rocha *et al.* (2013) e encontram-se relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 – Amostras preparadas e utilizadas na categorização da relação $E2/E6$ e valores dessa relação determinados experimentalmente

Amostras Misturas pHPV16 – pE6 (%)	Categorização	Valores médios da 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

Fonte: de LIMA ROCHA *et al.*, 2013, p. 65.

5.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa “Sigma Stat” versão 2.03 e apresentados como média e desvio padrão no caso de distribuição normal, enquanto os resultados que não seguiram distribuição normal foram apresentados como mediana e intervalo interquartil (IQ). Foi utilizado o teste de Shapiro Wilk para determinar se a distribuição era normal ou não. Para as variáveis com distribuição normal foi empregada a análise de variância (ANOVA) seguido de teste de comparação múltipla de Tukey para comparação de três grupos, e para as situações de comparação de dois grupos, foi realizado o teste t de Student. Para aquelas variáveis que não apresentaram distribuição normal, foi empregado o método não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn’s para comparação de mais de dois grupos e o teste não paramétrico de Mann Whitney para comparação de dois grupos. A investigação da correlação entre os

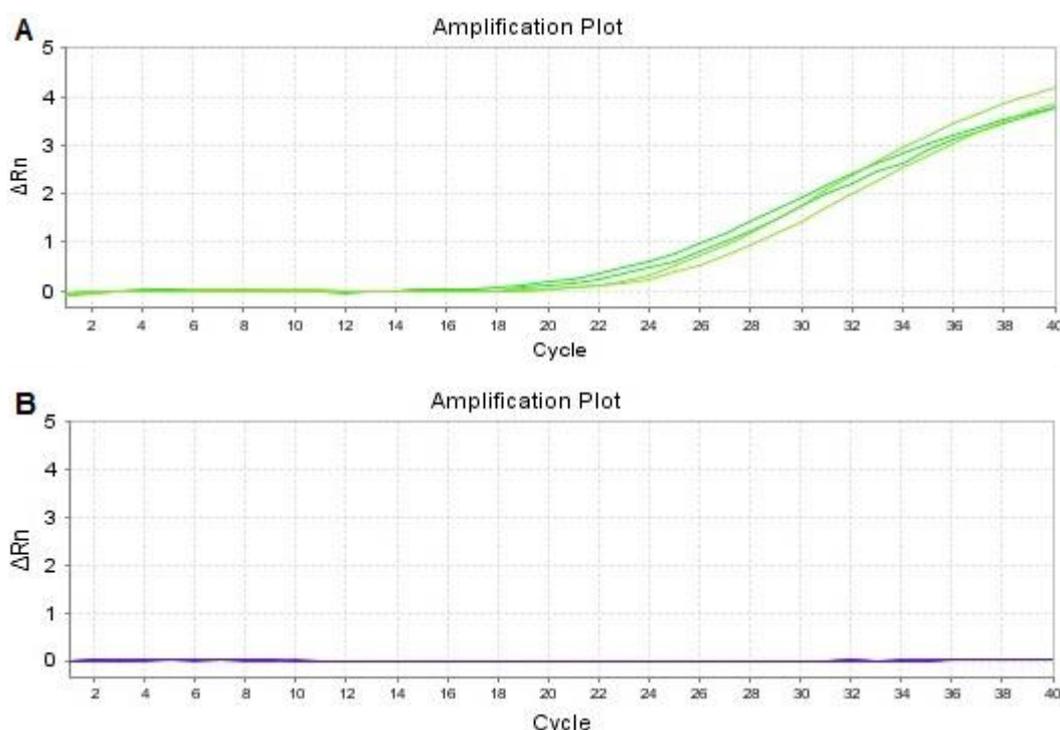
parâmetros estudados foi realizada pela correlação de Pearson para variáveis quantitativas e Spearman para variáveis qualitativas. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Padronização dos métodos de extração do DNA

Amostras na forma de lisado e DNA purificado foram testadas com o objetivo de verificar qual das metodologias de extração seria utilizada neste trabalho. As primeiras (amostras de lisado) apresentaram melhor reprodutibilidade e eficiência de amplificação por PCR em tempo real (Figura 8), e melhor índice de positividade na PCR convencional (dado não mostrado), sendo por isso escolhidas para as demais análises.

Figura 8 - Representação das amplificações das amostras testadas através da PCR em tempo real



Representação das amplificações das amostras a serem utilizadas nas PCRs convencionais e em tempo real. A padronização foi realizada testando duas amostras em duplicata extraídas na forma de lisado (A), e as mesmas duas amostras em duplicata na forma extraída até a forma de DNA purificado (B).

As amostras na forma de lisado e DNA purificado foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop ND-Lite (Thermo Scientific®), com o objetivo de verificar e comparar a concentração e a pureza do DNA extraído. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 2.

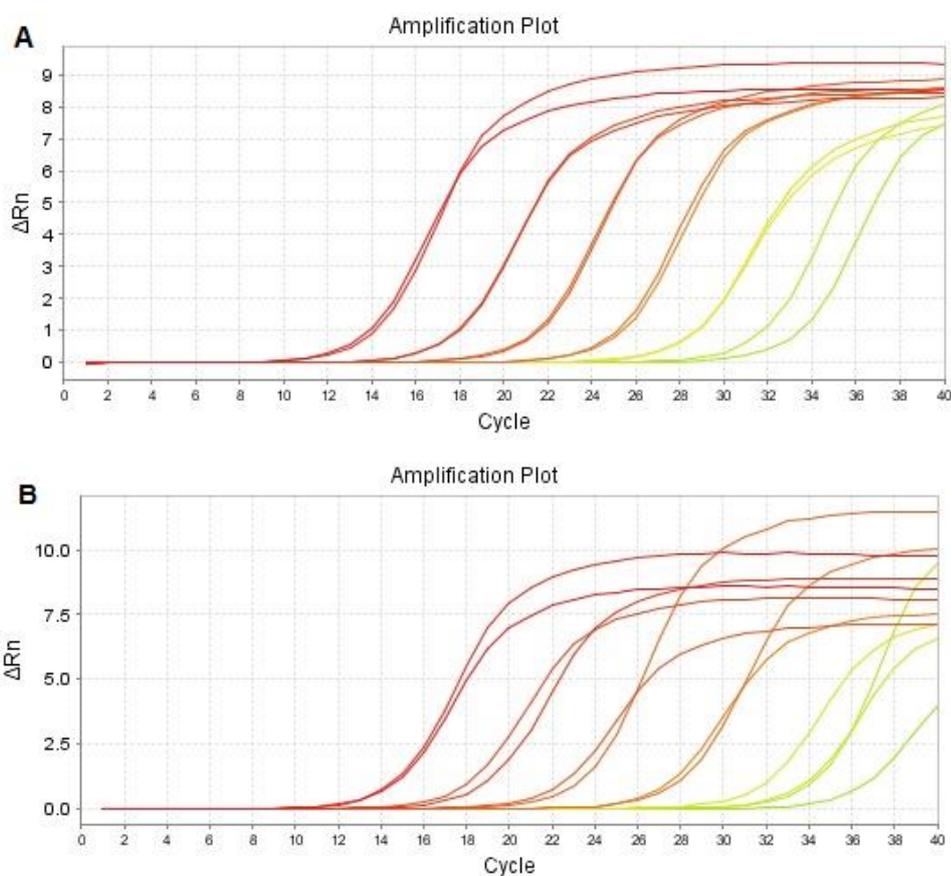
Tabela 2 – Resultado da quantificação de DNA das amostras extraídas

Amostras	Quantificação DNA	Pureza (DNA/proteína)
Lisado		
1	580,4 ng/μl	0,78
2	590,0 ng/μl	0,55
DNA purificado		
1	396,3 ng/μl	1,48
2	454,6 ng/μl	1,51

6.2 Padronização dos métodos de PCR em Tempo Real

Para a etapa de padronização da quantificação da carga viral dos HPV-6/11 foram construídas duas curvas padrão, uma contendo apenas o plasmídeo pHPV-6 e outra apenas o plasmídeo pHPV-11 (Figura 9).

Figura 9 – Curvas padrão dos plasmídeos pHPV-6 e pHPV-11



Curvas padrão representativas das padronizações das PCRs em tempo real para as curvas com os plasmídeos pHPV-11(A) e pHPV-6 (B).

Ambas apresentaram a mesma sensibilidade frente aos oligonucleotídeos utilizados, como apresentado na Figura 9. Porém, foi escolhida para os experimentos subsequentes a curva pHPV-11, pois apresentou melhor uniformidade e melhores resultados frente à diluição seriada das concentrações de plasmídeos, conforme mostrada na Figura 9.

As condições utilizadas nas reações de PCR em tempo real padronizadas para os genes *E6* e *E2*, regiões de dobradiça e aminoterminal do HPV-16, HPV-6/11 e β - actina estão descritas nos Quadros 17 e 18.

Quadro 17 – Reagentes utilizados no preparo de 20 μ L de reação de PCR

Reagentes (Concentração)	β- actina (μL)	HPV- 6/11 (μL)	E6 HPV- 16 (μL)	E2 HPV-16 (dobradiça) (μL)	E2 HPV-16 (aminoterminal) (μL)
Tampão SYBR-Green*	10	10	10	10	10
Dye*	0,3	0,3	0,3	0,3	
Primer “ANTI-SENSE” (5 pmol/ μ L)	3,6	0,8	1,2	1,2	1,2
Primer “SENSE” (5 pmol/ μ L)	1,2	1,2	3,6	1,2	1,2
DNA (407 ng/ μ l)	2	2	2	2	2
H2O qsp 20 μ L	2,9	5,7	2,9	5,3	5,3

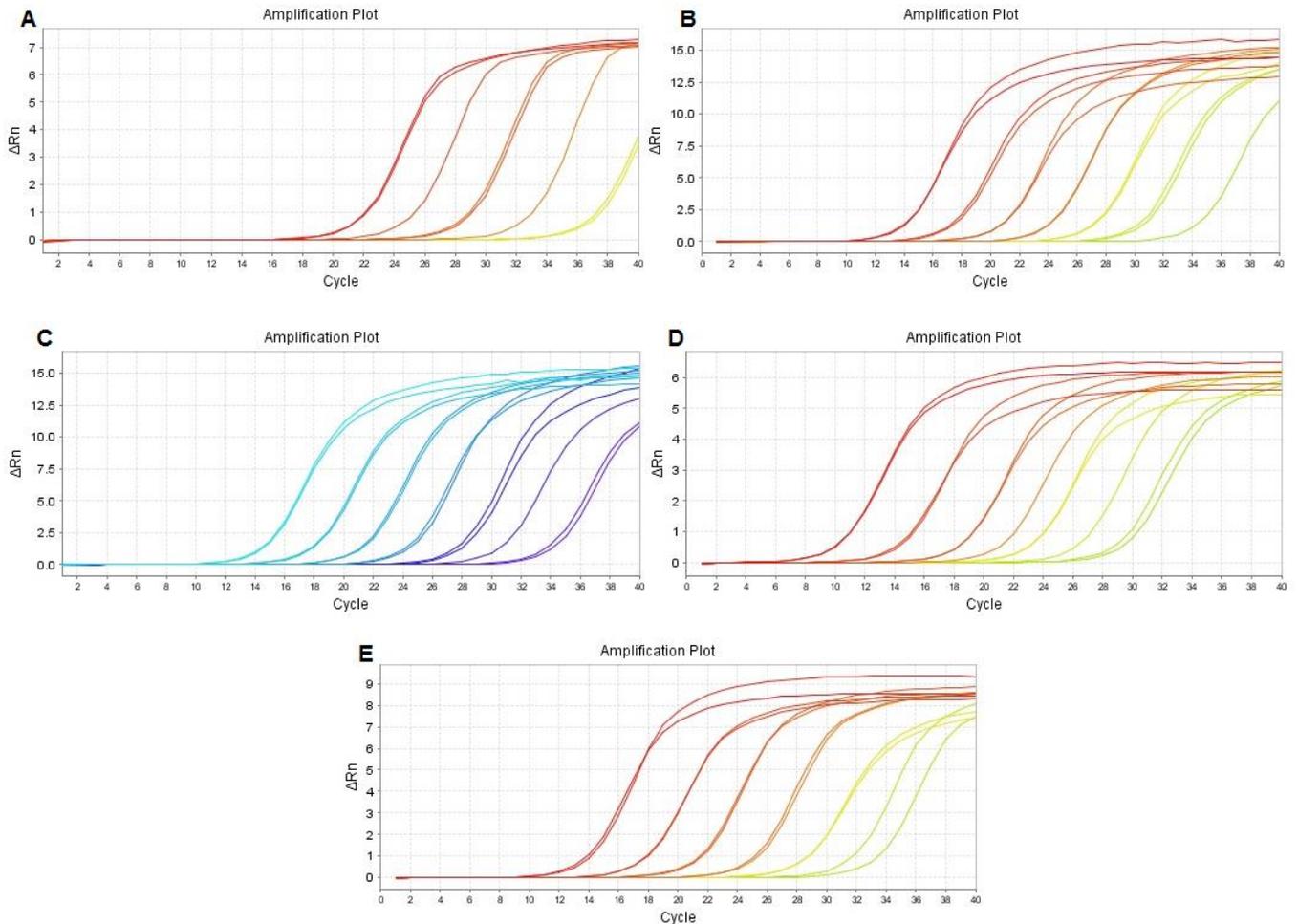
* Reagente Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies)

Quadro 18 – Etapas dos programas de amplificação das reações de PCR

Etapas da reação de PCR			
Oligonucleotídeos	Desnaturação	Anelamento/ Extensão	Nº de ciclos
β- actina β- act 1/ β- act 2	94°C 1 minuto	70°C 1 minuto	40
HPV 6/11	94°C 1 minuto	64°C 1 minuto	40
E6 HPV-16 E6 5/ E6 6	94°C 1 minuto	62°C 1 minuto	40
E2 HPV-16 (dobradiça) E2 7/ E2 8	94°C 1 minuto	62°C 1 minuto	40
E2 HPV-16 (aminoterminal) E2 F10/ E2 R10	94°C 1 minuto	60°C 1 minuto	40

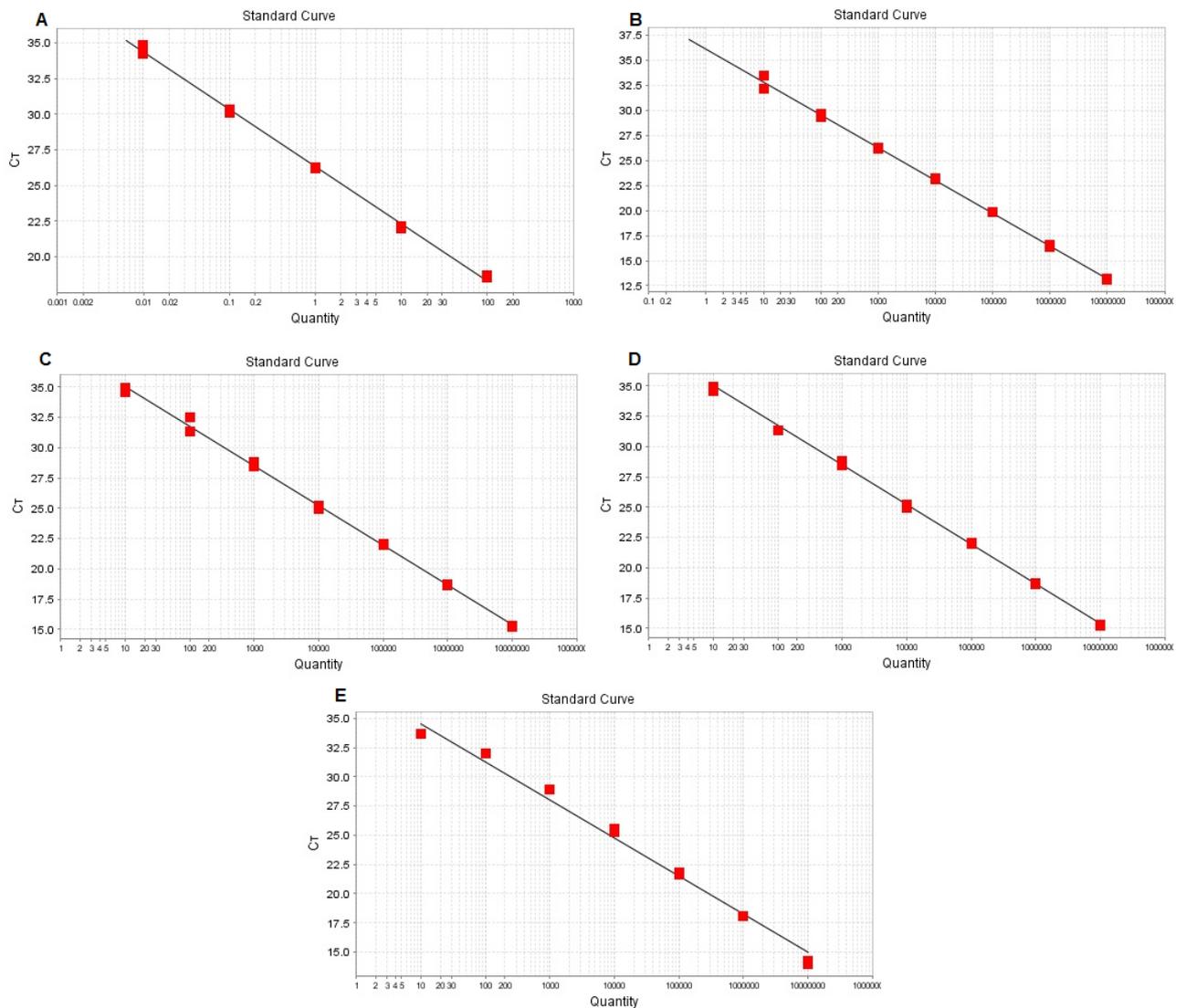
Curvas de amplificação, curvas padrão e curvas melting que exemplificam as reações de PCR em tempo real padronizadas e utilizadas durante este estudo (genes E6, E2 região de dobradiça e região amino terminal do HPV-16, HPV-6/11 e β- actina) encontram-se nas Figuras 10, 11 e 12. Todas as curvas foram 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.

Figura 10 – Curvas de amplificação das reações de PCR em tempo real padronizadas e utilizadas durante este estudo



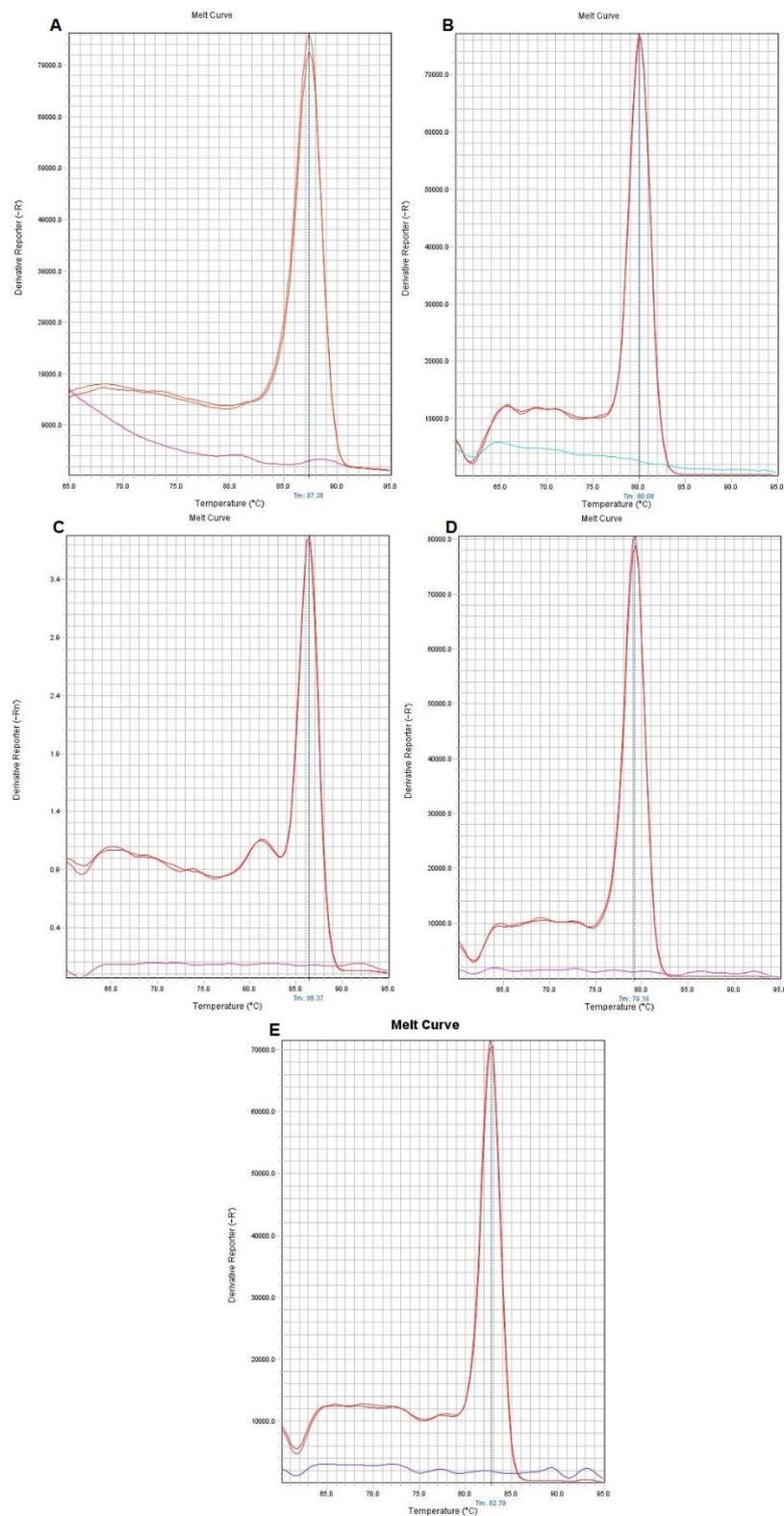
Curvas de amplificação obtidas pela plotação dos valores de ciclo de PCR vs fluorescência. Cada curva sigmóide representa uma amostra da curva padrão e suas réplicas. β -actina (A) – Curva padrão 10^2 a 10^{-2} ng de DNA total, gene E6 HPV-16 (B), gene E2 HPV-16 região de dobradiça (C) e amino terminal (D) e HPV-6/11 (E). Nestes últimos quatro gráficos, a curva padrão foi construída nas concentrações de 10^7 a 10 cópias dos plasmídeos contendo os respectivos genes E6 HPV-16 (pE6), E2-HPV-16 (pHPV-16) e o genoma completo HPV-6/11 (pHPV-6/11).

Figura 11 - Curvas padrão das reações de PCR em tempo real padronizadas e utilizadas durante este estudo



Curvas padrão construídas 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 por regressão linear dos pontos obtidos. Cada ponto vermelho representa uma amostra da curva padrão assim obtida. β -actina (A), gene E6 HPV-16 (B) e gene E2 HPV-16 região de dobradiça (C) e amino terminal (D), HPV-6/11 (E). A eficiência das curvas padrão variou de 90 a 110% e o *slope* de -2,98 a -3,65, calculados a partir da linha de regressão das curvas padrão.

Figura 12 - Curvas melting das reações de PCR em tempo real padronizadas e utilizadas durante este estudo



Curva melt: derivação repórter x temperatura. Curvas obtidas 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. β -actina (A), gene E6 HPV-16 (B), gene E2 HPV-16 região de dobradiça (C) e amino terminal (D) e HPV-6/11 (E).

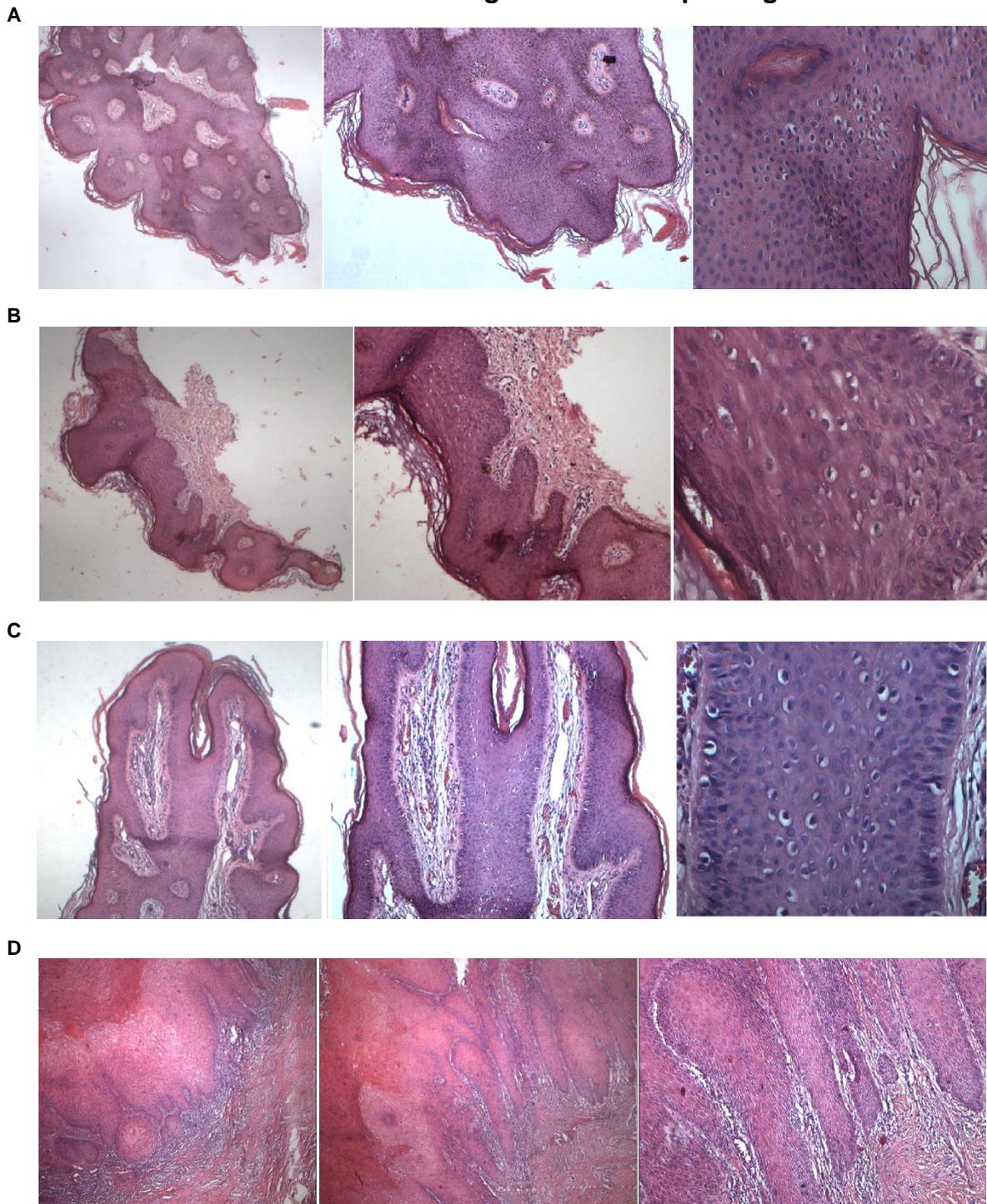
6.3 Análise histopatológica

Todas as amostras de tecido incluídas em parafina utilizadas neste trabalho foram analisadas histopatologicamente, tendo a presença da lesão no bloco confirmada e seu diagnóstico revisto e refinado para fins desta pesquisa. As análises foram realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica da Escola de Medicina da UFMG. As lesões do grupo Condiloma foram classificadas histopatologicamente como: 1) Papiloma, displasia que pode ou não ser provocada pelo HPV, 2) Verruga e 3) Condiloma, ambas displasias provocadas pelo HPV, no entanto, o primeiro diagnóstico consiste na presença de coilócitos nas camadas superiores e o segundo, além dos coilócitos, há também a presença de atipias nas camadas inferiores e uma displasia mais intensa. As amostras de câncer peniano também foram analisadas. Os diferentes diagnósticos histopatológicos associados ao n amostral encontram-se descritos no Quadro 19 e o exame histopatológico realizado tem representação fotográfica na Figura 13. Não foram encontradas lesões intraepiteliais de alto grau nas amostras de condiloma acuminado.

Quadro 19 - Relação de amostras de condiloma acuminado e câncer peniano utilizadas neste estudo e seus respectivos diagnósticos histopatológicos

Diagnóstico Histopatológico	n amostral
Papiloma	10
Verruga	49
Condiloma	27
Câncer peniano	23
Total	109

Figura 13 – Fotografias representativas das amostras utilizadas neste estudo em seus diferentes diagnósticos histopatológicos



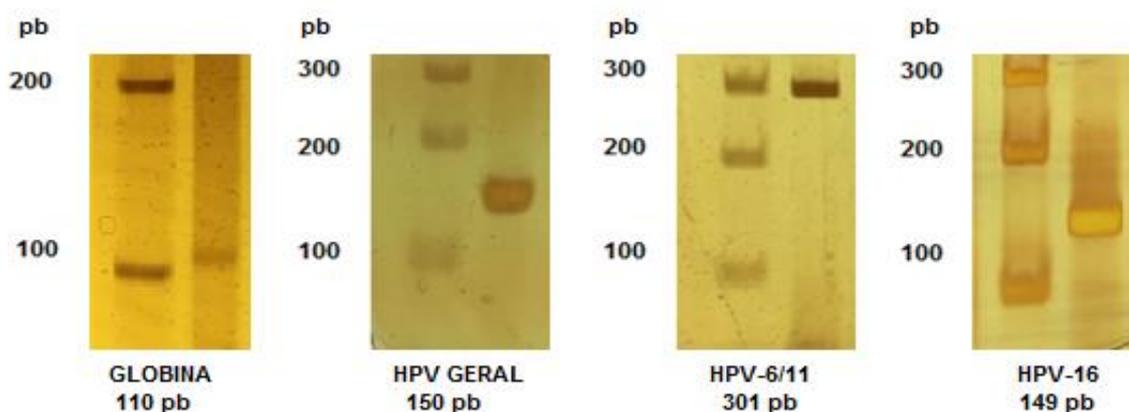
(A) Amostra de Papiloma, da esquerda para direita, aumento de 8x, 20x e 80x. Observar intensa proliferação celular, mas sem atipias significativas. (B) Amostra de Verruga, da esquerda para direita, aumento de 8x, 20x e 80x. Observar displasia e coilocitose na superfície do tecido. (C) Amostra de Condiloma, da esquerda para direita, aumento de 8x, 20x e 80x. Observar displasia e coilocitose na parte profunda do tecido. (D) Amostra de Câncer Peniano, da esquerda para direita, aumento de 4x, 10x e 10x. Observar blocos de células neoplásicas invadindo o tecido conjuntivo subjacente. As imagens foram fotografadas através de microscópio Olympus, modelo BX51.

6.4 Prevalência da infecção por HPV

Neste estudo, os dados relativos à idade dos pacientes foram obtidos através dos laudos fornecidos pelo Laboratório de Anatomia Patológica juntamente com as amostras. A média de idade dos homens com diagnóstico de condiloma acuminado foi de 35 anos (mínima de 18 e máxima de 69 anos) e mediana de 32. A média de idade dos homens com diagnóstico de carcinoma peniano foi de 41 anos (mínima de 23 e máxima de 92 anos) e mediana de 64.

Foram analisadas 109 amostras e todas as amostras foram positivas para o gene de β -globina. Em sequência foram realizadas as PCRs para detecção da infecção por HPV e tipagem para o HPV-6/11 e o HPV-16. A Figura 14 mostra alguns exemplos de géis de eletroforese em poliacrilamida obtidos na tipagem, apresentando os fragmentos de DNA do tamanho esperado.

Figura 14 - Géis de poliacrilamida corados pelo nitrato de prata



Exemplos de géis de eletroforese em poliacrilamida a 6%, corados pelo nitrato de prata, obtidos após aplicação dos produtos da PCR (segunda coluna) para identificação do gene de β -globina (110 pb), detecção da presença do HPV (150 pb), tipagem do HPV-6/11 (301 pb) e HPV-16 (149 pb). Na primeira coluna é representado o padrão de peso molecular.

Dentre as 109 amostras analisadas, 86 eram de condiloma acuminado e 23 de câncer peniano. A prevalência da infecção por HPV foi de 52% (12/23) nas amostras de carcinoma, sendo que 75% (9/12) apresentaram apenas o DNA-HPV do tipo 16 e 17% (2/12) apresentaram múltiplas infecções sendo positivas para DNA-HPV-16 e 6/11. Uma amostra foi negativa para estes dois tipos virais. Das amostras de condiloma acuminado, 80% (69/86) foram positivas para DNA-HPV, sendo 71%

(49/69) positivas apenas para DNA-HPV-6/11, 12% (8/69) apresentaram múltiplas infecções sendo positivas para DNA-HPV-16 e -6/11. Das 86 amostras analisadas, 17% (12/69) foram negativas para ambos os tipos 16 e 6/11. As amostras DNA-HPV positivas, porém, negativas na tipagem para HPV-16 e HPV-6/11, podem apresentar outros tipos virais não pesquisados.

As amostras de condiloma acuminado foram estratificadas segundo a classificação histopatológica em: papiloma, verruga e condiloma acuminado. A Tabela 3 mostra a prevalência da infecção por HPV em todas as amostras analisadas.

Tabela 3 – Prevalência da infecção por HPV nas 109 amostras analisadas

HPV	Total n (%)	Estratificação do grupo Condiloma Acuminado			
		Papiloma	Verruga	Condiloma	Carcinoma
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Apenas 16	9 (8)	0	0	0	9 (39)
Apenas 6/11	49 (45)	5 (6)	27 (31)	17 (20)	0
Múltipla infecção (16 + 6/11)	10 (9)	0	3 (3)	5 (6)	2 (9)
Outros tipos	13 (12)	4 (5)	5 (6)	3 (4)	1(4)
Negativos	28 (26)	1 (1)	14 (16)	2 (2)	11 (48)
Total de pacientes	109	10 (12)	49 (56)	27 (32)	23

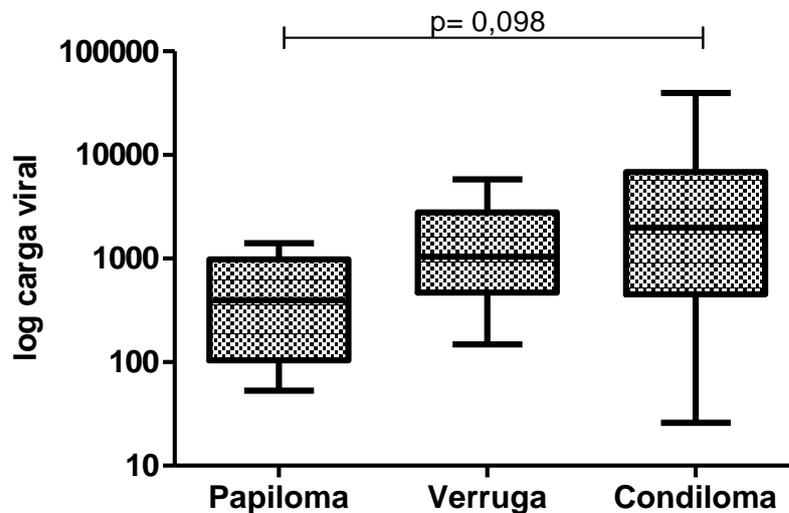
6.5 Carga viral

6.5.1 Determinação da carga viral do HPV-6/11

A carga viral do HPV-6/11 nas amostras do grupo condiloma acuminado (57) infectadas apenas por esse vírus ou em múltipla infecção com o HPV-16, variou de 26,49 a 39.506,66 vírus/célula (mediana: 1.043,66, IQ: 401,14 – 3535,96). A carga viral do HPV-6/11 nas amostras de câncer (2) foi de 4,69 e 12,02. Não foi realizado teste estatístico de comparação da mediana da carga viral destes dois grupos devido ao pequeno número de amostras de câncer peniano (n= 2) (Tabela 4).

O grupo condiloma acuminado foi estratificado de acordo com a revisão histopatológica em papiloma (5), verruga (30) e condiloma acuminado (22) (Tabela 4). Não foi observada diferença significativa para a mediana da carga viral ao comparar estes grupos ($p= 0,098$) (Tabela 4), porém observa-se um aumento da carga viral do HPV-6/11 à medida que a lesão se agrava (Figura 15).

Figura 15 - Carga viral do HPV-6/11 em amostras de Papiloma, Verruga e Condiloma

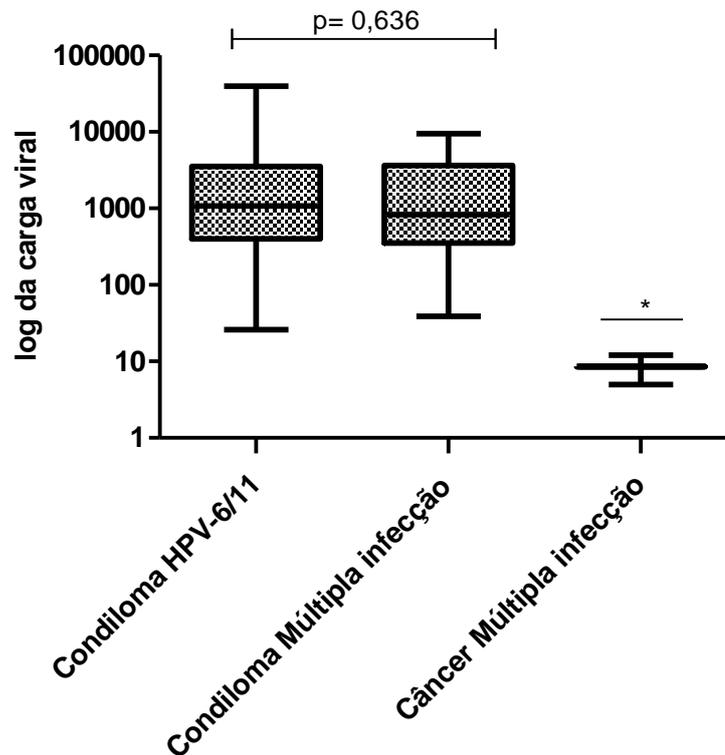


Comparação dos valores logarítmicos de carga viral do HPV-6/11 em amostras de acordo com a classificação histopatológica do grupo Condiloma acuminado.

As duas amostras de câncer positivas para o HPV-6/11, também estavam infectadas pelo HPV-16. Das 57 amostras de condiloma acuminado, oito estavam em múltipla infecção com este tipo viral. A carga viral do HPV-6/11 foi, portanto, avaliada de acordo com a presença ou não da infecção pelo HPV-16 nas diferentes amostras.

As amostras de condiloma acuminado quando em múltipla infecção (8) apresentaram variação da carga viral de 38,96 a 9.474,15 vírus/células (mediana: 833,13, IQ: 353,22 - 3625,73) e quando infectadas com HPV-6/11, na ausência de HPV-16 (49) tiveram sua carga viral variando de 26,49 a 39.506,66 vírus/célula (mediana 1.075,88, IQ: 401,14 - 3535,96) (Tabela 4). Não foi observada diferença significativa para a mediana da carga viral do HPV-6/11 nestes dois grupos ($p= 0,636$) (Figura 16).

Figura 16 – Carga viral do HPV-6/11 em amostras de Condiloma e Câncer



Comparação dos valores logarítmicos de carga viral do HPV-6/11 das amostras do grupo condiloma infectadas com HPV-16, grupo condiloma infectadas pelo HPV-16 e HPV-6/11 (múltipla infecção) e amostras de câncer infectadas com HPV-16 e HPV-6/11 (múltipla infecção). * Não foi possível realizar análise estatística devido ao n amostral do grupo “Câncer em múltipla infecção HPV-6/11 + HPV-16” (n = 2). Teste Mann-Whitney; $p < 0,050$ como significativo.

A carga viral do HPV-6/11 do grupo condiloma acuminado foi avaliada quanto à presença de múltipla infecção com o HPV-16 e quanto à estratificação do grupo de acordo com seu diagnóstico histológico. Ambas as análises não foram significativas estatisticamente ($p = 0,333$ e $p = 0,938$, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de carga viral do HPV-6/11 (vírus/célula) nas amostras analisadas e sua variação em relação ao diagnóstico histopatológico e em presença de múltiplas infecções

Variáveis (n amostral)	Mediana da carga viral (intervalo interquartil) (vírus/célula)	Variações (vírus/célula)	Valor p
Total de amostras			
Condiloma acuminado (57)	1043,66 (401,14 – 3535,96)	26,49 a 39.506,66	*
Câncer peniano (2)	8,35	4,69 e 12,02	
Grupo condiloma acuminado estratificado de acordo com a análise histopatológica			
Papiloma (5)	395,90 (104,64 - 980,88)	52,86 a 1.403,63	0,098 ¹
Verruga (30)	1039,77 (469,22 - 2777,91)	149,35 a 5.816,58	
Condiloma (22)	1990,97 (451,12 - 6864,39)	26,49 a 39.506,66	
Grupo condiloma acuminado estratificado de acordo com a análise histopatológica e presença de múltipla infecção com o HPV-16			
Verruga infecção HPV-6/11 (27)	1075,88 (490,17 - 2887,18)	149,35 a 5.816,58	0,333 ²
Verruga em múltipla infecção HPV-6/11 + HPV-16 (3)	630,38 (305,20 - 1035,88)	305,21 a 1.035,89	
Condiloma infecção HPV-6/11 (17)	1886,98 (424,75 - 7389,59)	26,49 a 39.506,66	0,938 ²
Condiloma em múltipla infecção HPV-6/11 + HPV-16 (5)	2130,36 (268,10 - 6799,17)	38,96 a 9.474,15	
Grupo condiloma acuminado estratificado de acordo com a presença de múltipla infecção com o HPV-16			
Condiloma infecção HPV-6/11 (49)	1075,88 (401,14 - 3535,96)	26,49 a 39.506,66	0,636 ²
Condiloma em múltipla infecção HPV-6/11 e HPV-16 (8)	833,13 (353,22 - 3625,73)	38,96 a 9.474,15	
Total de amostras estratificadas de acordo com a presença de múltipla infecção com o HPV-16			
Condiloma infecção HPV-6/11 (49)	1075,88 (401,14 - 3535,96)	26,49 a 39.506,66	*
Condiloma em múltipla infecção HPV-6/11 + HPV-16 (8)	833,13 (353,22 - 3625,73)	38,96 a 9.474,15	
Câncer em múltipla infecção HPV-6/11 + HPV-16 (2)	8,35	4,69 e 12,02	

¹ Teste Kruskal-Wallis; ² Teste Mann-Whitney; * Não foi possível realizar análise estatística devido ao n amostral do grupo “Câncer em múltipla infecção HPV-6/11 + HPV-16” (n = 2); p<0,050 como significativo.

6.5.2 Determinação da carga viral HPV-16

A variação na carga viral do HPV-16 no grupo de condiloma acuminado (8) foi de 0,01 a 918,96 vírus/célula (mediana: 90,05, IQ: 0,94 - 555,52). Em todas as amostras havia múltipla infecção com o HPV-6/11. Nas amostras de câncer (11) a variação da carga viral do HPV-16 foi de 0,00003 a 242,06 vírus/célula (mediana: 0,02, IQ: 0,0007 - 81,33), sendo que 2 amostras estavam também infectadas pelo HPV-6/11. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de carga viral do HPV-16 quando se compara estes dois grupos ($p = 0,052$) (Tabela 5).

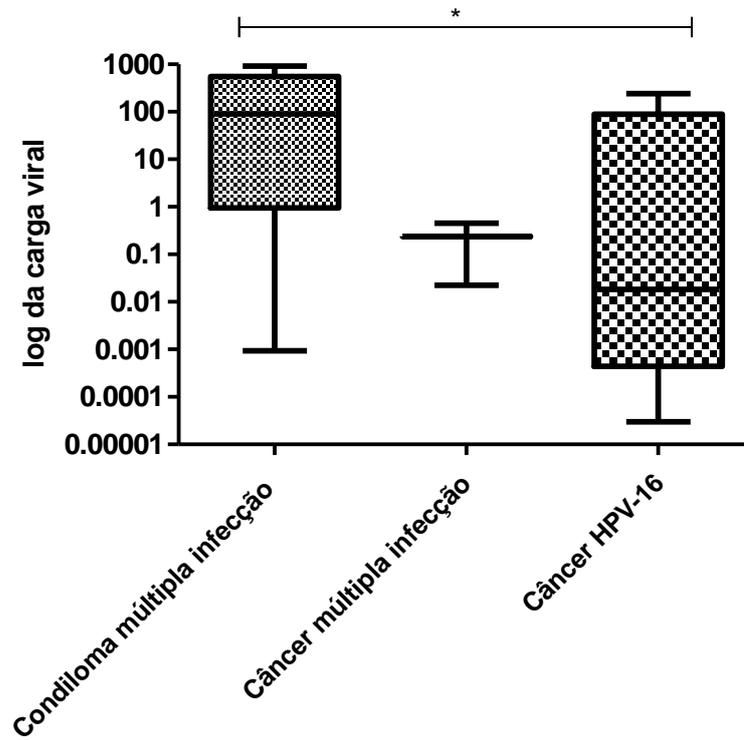
Foi verificada a variação da carga viral do HPV-16 entre as amostras de condiloma acuminado estratificadas de acordo com a análise histopatológica (5 amostras de condiloma acuminado e 3 amostras de verruga) e também com as amostras de câncer peniano (11). Porém não foram observadas diferenças significativas nos valores de carga viral do HPV-16 entre os grupos, sendo respectivamente, $p = 0,786$ e $p = 0,223$ (Tabela 5). Não havia amostras de papiloma infectadas pelo HPV-16.

Não foi possível realizar análise estatística entre a carga viral do HPV-16 em amostras de câncer quando em múltipla infecção com HPV-6/11 (2) e infectadas apenas pelo HPV-16 (9) devido ao n amostral das amostras de câncer quando em múltipla infecção com HPV-6/11 ($n = 2$) (Tabela 5).

Foi realizado análise estatística da carga viral do HPV-16 entre as amostras do grupo condiloma acuminado não estratificado (8) e as amostras de câncer infectadas apenas pelo HPV-16 (9), porém não foi encontrado diferença estatística significativa ($p = 0,074$).

A Figura 17 exemplifica a comparação entre o grupo condiloma, câncer em múltipla infecção e câncer sem infecção pelo HPV 6/11. Observa-se que em amostras de condiloma a carga viral do HPV-16 apresenta-se maior do que no câncer, sendo que em amostras de câncer com múltipla infecção a carga viral apresenta-se maior do que nas amostras de câncer não infectadas pelo HPV-6/11.

Figura 17 – Carga viral do HPV-16 em amostras de Condiloma e Câncer



Valores logarítmicos de carga viral do HPV-16. Comparação entre os grupos condiloma múltipla infecção, câncer múltipla infecção e câncer com infecção apenas pelo HPV-16. * Não foi possível realizar análise estatística devido ao n amostral do grupo "Câncer em múltipla infecção HPV-6/11 + HPV-16" (n = 2).

Tabela 5 – Valores de carga viral do HPV-16 (vírus/célula) nas amostras analisadas e sua variação em relação ao diagnóstico histopatológico e em presença de múltiplas infecções

Variáveis (n amostral)	Mediana da carga viral (intervalo interquartil) (vírus/célula)	Variações (vírus/célula)	Valor p
Total de amostras			
Condiloma acuminado (8)	90,05 (0,94 - 555,52)	0,001 a 918,96	0,052 ²
Câncer peniano (11)	0,02 (0,0007 - 81,33)	0,00003 a 242,06	
Grupo condiloma acuminado estratificado de acordo com a análise histopatológica e câncer			
Verruga (3)	3,56 (0,0009 - 918,96)	0,001 a 918,96	0,786 ²
Condiloma (5)	175,01 (2,58 - 443,06)	0,08 a 667,98	
Verruga (3)	3,56 (0,0009 - 918,96)	0,001 a 918,96	0,223 ¹
Condiloma (5)	175,01 (2,58 - 443,06)	0,08 a 667,98	
Câncer infecção HPV-16 (11)	0,02 (0,0004 - 89,66)	0,00003 a 242,06	
Grupo câncer peniano estratificado de acordo com a presença de múltipla infecção com o HPV-6/11			
Câncer em múltipla infecção HPV-6/11 + HPV-16 (2)	0,24	0,02 e 0,45	*
Câncer infecção HPV-16 (9)	0,02 (0,0004 - 89,66)	0,00003 a 242,06	
Grupo câncer peniano estratificado de acordo com a presença de múltipla infecção com o HPV-6/11 comparado com o grupo condiloma acuminado também em múltipla infecção			
Condiloma acuminado (8)	90,05 (0,94 - 555,52)	0,001 a 918,96	0,074 ²
Câncer infecção HPV-16 (9)	0,02 (0,0004 - 89,66)	0,00003 a 242,06	
Câncer em múltipla infecção HPV-6/11 e HPV-16 (2)	0,24	0,02 e 0,45	*

¹ Teste Kruskal-Wallis; ² Teste Mann-Whitney; * Não foi possível realizar análise estatística devido ao n amostral do grupo "Câncer em múltipla infecção HPV-6/11 + HPV-16" (n = 2); p<0,050 como significativo.

6.6 Estado físico do DNA-HPV-16

Das 69 amostras de condiloma acuminado positivas para o DNA-HPV, apenas oito apresentaram infecção pelo HPV-16 em múltipla infecção com o HPV-6/11. Em relação a estas amostras, DNA-HPV-16 encontrava-se na forma epissomal em 12% (01/08) e na forma mista (epissomal e integrada) em 76% (06/08), em uma delas não foi possível detectar a integração devido a sua carga viral muito baixa (0,001 vírus/célula). Não foi verificada nenhuma amostra com HPV-16 na forma integrada no grupo condiloma.

As amostras de condiloma acuminado foram estratificadas de acordo com a análise histopatológica (papiloma, verruga e condiloma). Não foi encontrado DNA-HPV-16 nas amostras de papiloma. Devido ao n amostral muito pequeno, não foi possível realizar nenhum teste estatístico (Tabela 6).

Tabela 6 – Estado físico do DNA-HPV-16 de acordo com a análise histopatológica das amostras

Amostras (n)		Estado físico n (%)		
		Integrado	Misto	Epissomal
Condiloma acuminado (7)	Verruga (2)	0	2 (100)	0
	Condiloma (5)	0	4 (80)	1* (20)
Câncer peniano (11)	Múltipla infecção (2)	1* (50)	1* (50)	0
	Infecção HPV-16 (9)	7 (78)	2 (22)	0
Total		8	9	1

* O pequeno n amostral impossibilitou a realização de análise estatística

Das 12 amostras de câncer positivas para DNA-HPV, 11 foram positivas para HPV-16. Em relação ao estado físico do HPV-16 nessas amostras, 73% (8/11) apresentavam integrados e 27% (3/11) estavam na forma mista. Duas amostras possuíam múltipla infecção com o HPV-6/11, sendo que em uma o DNA-HPV-16 se encontrava na forma mista e outra integrado. Nenhuma das amostras possuía o HPV-16 na sua forma epissomal. Devido ao n amostral muito pequeno, também não foi possível realizar nenhum teste estatístico (Tabela 7), mas pôde-se observar uma

tendência de integração nas amostras infectadas pelo HPV-16, na ausência do HPV-6/11 (7/11, 64%).

O estado físico do DNA-HPV-16 foi comparado à carga viral. Observou-se que esta reduz à medida que o vírus se integra no genoma do hospedeiro. Não se pode fazer inferências quanto à forma episomal já que o n amostral é muito pequeno. Foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Tabela 7).

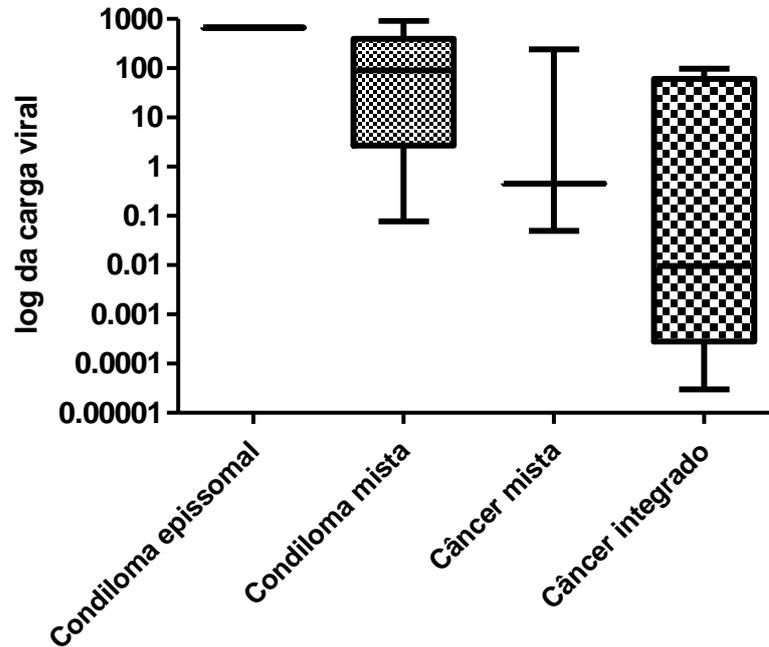
Tabela 7 – Estado físico DNA-HPV-16 e valores de carga viral (vírus/célula)

Estado físico (n)	Mediana da carga viral ± intervalo interquartil (vírus/célula)	Variações (vírus/célula)	Valor p
Integrado (8)	0,01 ± 40,67	0,00003 a 98,00	0,011 ¹
Misto (9)	5,08 ± 229,84	0,05 a 918,96	
Epissomal (1)	-	667,98	*

¹ Teste Mann-Whitney; * Não foi possível realizar análise estatística devido ao n amostral; p<0,050 como significativo.

A Figura 18 demonstra a evolução da carga viral à medida que o processo de integração acontece. Apesar do n amostral da amostra de estado físico episomal (n=1) impossibilitar a análise estatística, pode-se observar uma redução gradativa.

Figura 18 – Carga viral do HPV-16 em amostras de Condiloma e Câncer



Valores logarítmicos de carga viral do HPV-16. Comparação entre o grupo Condiloma com DNA-HPV-16 nas formas epissomal e mista e câncer com DNA-HPV-16 nas formas mista e integrada. n amostral da amostra de estado físico epissomal (n=1).

A variação da carga viral do HPV-16 foi também analisada nos diferentes estados físicos e os resultados encontram-se descritos na Tabela 8. Novamente o pequeno n amostral impossibilitou a maior parte das análises estatísticas. Não foi encontrada diferença significativa de carga viral ao se comparar amostras de câncer no estado físico integrado com o misto (Tabela 8).

Tabela 8 – Estado físico do DNA-HPV-16 em relação ao diagnóstico histopatológico e respectiva carga viral

Amostras (n)	Estado físico HPV-16 (n)	Carga viral (cópias/células)	Valor de p
Grupo condiloma acuminado estratificado de acordo com a análise histopatológica			
Verruga (2)	Misto (2)	3,56 e 918,96	*
Condiloma (5)	Misto (4)	90,05 ± 206,03	
	Epissomal (1)	667,98	
Grupo condiloma acuminado e câncer			
Condiloma (7)	Misto (6)	175,01 ± 664,42	*
	Epissomal (1)	667,98	
Câncer (11)	Integrado (8)	0,00961 ± 61,00	0,1333 ¹
	Misto (3)	0,45 ± 242,00	

¹Teste Mann-Whitney; * Não foi possível realizar análise estatística devido ao n amostral; p<0,050 como significativo.

A amostra com DNA-HPV-16 na forma epissomal foi também testada para verificar a existência de uma possível quebra em outra região da proteína E2, a aminoterminal. Esta quebra não foi detectada e a amostra permaneceu classificada como epissomal.

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, 80% das amostras de condiloma acuminado apresentaram-se positivas para o DNA-HPV. Condilomas acuminados são causados através da infecção da mucosa pelo HPV (SARAIYA *et al.*, 2015; SAFI *et al.*, 2013; COSTA-SILVA *et al.*, 2017). Estudos relatam a detecção de 90 a 100% do HPV em amostras de condiloma acuminado (da SILVA *et al.*, 2017; de LIMA ROCHA, 2013), detecção essa, maior que a encontrada nesse estudo. Vale ressaltar que nos estudos citados acima, o material analisado consistiu de amostras citológicas, e não amostras de tecido parafinados como as utilizadas neste trabalho.

Durante o processamento das amostras para posterior inclusão em parafina, os tecidos são fixados em formaldeído. A fixação em formaldeído provoca a quebra de vários componentes presentes nos tecidos e a fragmentação de ácidos nucléicos, limitando a análise do DNA por redução da quantidade e tamanho dos produtos amplificados, em comparação com os produtos obtidos a partir de tecidos frescos ou congelados (ALVAREZ-ALDANA; MARTÍNEZ; SEPÚLVEDA-ARIAS, 2015; LEHMANN & KREIPE, 2001). O sucesso da amplificação do DNA por PCR em amostras parafinadas pode variar com o tipo de fixador utilizado, protocolo de fixação e tempo de armazenamento. Além disso, a amplificação pode ser prejudicada por inibidores de PCR, que ainda podem estar presentes após o processo de extração dessas amostras (DEDHIA *et al.*, 2010; HUIJSMANS *et al.*, 2010; LESNIKOVA *et al.*, 2010). Alvarez-Aldana, Martínez e Sepúlveda-Arias (2015) relataram em seu estudo, que teve como objetivo: a comparação de cinco protocolos de extração de DNA em tecidos parafinados para a detecção do HPV, que a fragmentação do DNA é um dos principais fatores que limitam o processo de detecção do DNA nessas amostras. Relataram ainda que a amplificação por PCR de um gene humano não reflete necessariamente o sucesso da extração do DNA viral. Esses fatos podem justificar a menor detecção do HPV nas amostras de condiloma acuminado, neste trabalho, se comparado com outros estudos.

Das amostras de condiloma acuminado positivas para o DNA-HPV, 83% foram positivas para o HPV-6/11. Este dado condiz com a literatura, onde os HPVs de baixo risco são os maiores causadores de condilomas (CHAN *et al.*; 2009; EGAWA; DOOBAR, 2017; HAWKINS *et al.*, 2013); sendo que os HPVs-6 e 11 são os tipos virais mais prevalentes, responsáveis por aproximadamente 90% dos casos de condilomas

acuminados (BALL *et al.*, 2011; da SILVA *et al.*, 2017; GIULIANO *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2017; NATUNEN *et al.*, 2011; SCHILLER, 2013).

Múltiplas infecções causadas pelo HPV-6/11 e HPV-16 foram encontradas em 12% das amostras de condiloma. De forma semelhante, trabalhos relatam a presença de HPV de alto risco em lesões benignas, variando de 12 a 48 % (ANIC *et al.*, 2011, BALL *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2017).

Apesar do condiloma acuminado ser considerado uma lesão benigna e não estar associado à mortalidade de seus portadores, essa condição pode desencadear problemas psicossociais, com redução da qualidade de vida, além de gerar custos para o estado e o indivíduo (CHONDROS *et al.*, 2018; PATEL *et al.*, 2013). Além disso, estudos relatam que condilomas acuminados podem ser um fator de risco para o desenvolvimento do câncer, onde a presença do condiloma acuminado aumentaria em 3,7 o risco de desenvolver o carcinoma (CHO *et al.*, 2017; POW-SANG *et al.*, 2010). Múltiplas infecções com HPVs de alto risco conferem ao condiloma acuminado um risco potencial para o desenvolvimento de tumores malignos (BENNETS *et al.*, 2015; BLOMBERG *et al.*, 2012; POW-SANG *et al.*, 2010). Sendo assim, a investigação dos tipos de HPV em condilomas acuminados é de suma importância para o acompanhamento do paciente, prevenção de recorrências e impedir a progressão para lesões mais graves como o câncer.

A média de idade dos homens com diagnóstico de condiloma acuminado foi de 35 anos, oscilando entre 18 e 69 anos e mediana de 32. Esses dados corroboram com aqueles da literatura, onde a incidência de condilomas acuminados é maior nos homens mais jovens (< 30 anos) e decresce significativamente com a idade (ANDERSON *et al.*, 2009; ANIC *et al.*, 2012; da SILVA *et al.*, 2017; LAZCANO-PONCE *et al.*, 2018). Mudanças no comportamento sexual são provavelmente o fator chave por trás da redução das taxas de verrugas genitais ao longo do tempo, e o desenvolvimento de uma resposta imunológica eficaz também pode colaborar para essa redução. A supressão ou redução da resposta imunológica local, pode favorecer a persistência e a multiplicação do HPV (BLOMBERG *et al.*, 2012; SHACTER; WEITZMAN, 2002). Dessa forma, alguns autores consideram que aspectos como comportamento sexual e a resposta imunológica podem influenciar na prevalência de múltiplas infecções (CHATURVERDI *et al.*, 2011). Além disso, infecções persistentes são menos comuns em homens, devido às maiores chances de *clearance* da infecção,

possivelmente devido a uma maior descamação das células epiteliais (GUILIANO *et al.*, 2011; MARKS *et al.*, 2011).

Em relação à idade dos pacientes com diagnóstico de câncer peniano encontrada neste trabalho, a média foi de 41 anos, oscilando entre 23 e 92 anos e mediana de 64. Pow-Sang *et al.* (2010) em um trabalho de revisão, relataram que o câncer peniano é mais comum em homens com idade entre 50 e 70 anos, o que condiz com o dado encontrado neste trabalho.

Neste trabalho, a prevalência do HPV nas amostras de câncer peniano foi de 52%. Estudos relatam que 22% a 63% dos casos de câncer de pênis são relacionados ao HPV (DO *et al.*, 2013; DE MARTEL *et al.*, 2017; SAKAMOTO *et al.*, 2019). O tipo mais comum nos casos de câncer peniano é o HPV-16, sendo sua prevalência relatada entre 50 a 89% dos casos (DO *et al.*, 2013; OLESEN *et al.*, 2018; SAKAMOTO *et al.*, 2019). Esse dado condiz com o presente trabalho, onde a prevalência do DNA-HPV-16 foi de 75% nas amostras de câncer peniano positivas para o DNA-HPV.

Múltiplas infecções pelos HPV-16 e HPV-6/11 estiveram presentes em 17% das amostras de câncer peniano. Alguns trabalhos também relataram a presença dos HPVs de baixo risco em amostras de câncer peniano. Olesen *et al.* (2018) verificaram que o HPV-6 foi o segundo tipo mais prevalente em carcinoma de pênis, depois do HPV-16. Sakamoto *et al.* (2019) detectaram positividade de 14,3% para DNA-HPV de baixo risco em múltipla infecção com outros tipos virais. Existem ainda, estudos em pacientes do sexo masculino, HIV positivos, onde foi verificado que a probabilidade de desenvolver lesão anal aumentou juntamente com o número crescente de tipos de HPV em múltiplas infecções (ALVAREZ *et al.*, 2010; CHENG *et al.*, 2017; ROVELLI *et al.*, 2017). Acredita-se que o aumento do risco do desenvolvimento de lesões nestes pacientes, se deve à potencialização da ação carcinogênica dos HPVs de alto risco presentes em múltiplas infecções com HPVs de baixo risco ou à presença de uma deficiência imunológica prévia e não sendo uma ação direta destes tipos virais (BENNETTS *et al.*, 2015).

Em lesões NIP a prevalência do DNA-HPV tem papel importante, sendo que vários estudos relataram a presença de HPVs de baixo risco nessas lesões, precursoras do câncer, em múltipla infecção com tipos virais de alto risco (da SILVA *et al.*, 2017; INGLES *et al.*, 2015; SUDENGA *et al.*, 2016). A hipótese de Kadaja *et al.* (2007) é de que as proteínas E1 e E2 produzidas pelas formas virais episomais,

podem atuar sob as formas integradas promovendo sua replicação e aumentando a frequência de integração. É sabido, que os vírus de baixo risco não se integram podendo, portanto, serem fornecedores de E1 e E2 nos casos de múltiplas infecções com vírus de alto risco, colaborando assim para potencializar o poder carcinogênico destes últimos. Trabalhos relatam a existência de proteção cruzada entre HPVs filogeneticamente próximos (FUXI *et al.*, 2009; HAJIA; SOHRABI, 2018; SENAPATI *et al.*, 2017; WHEELER *et al.*, 2009). Porém, ainda há questionamentos na literatura sob a questão de aumento na susceptibilidade ou exclusão competitiva/proteção cruzada entre os tipos virais. Acredita-se que múltiplas infecções dificultem o surgimento de uma resposta imune eficaz, favorecendo a persistência da infecção e o aumento da carga viral, levando a progressão das lesões ou câncer (CHOW *et al.*, 2010; DE SANJOSÉ; BROTONS; PAVÓN, 2018). Altas cargas virais do HPV foram associadas à redução do *clearance* da infecção, levando à persistência da infecção (LIU *et al.*, 2018; MARRA *et al.*, 2017; SENKOMAGO *et al.*, 2016).

Neste trabalho, a influência de múltiplas infecções pelos HPVs-16 e 6/11 no desenvolvimento de lesões e do próprio câncer foi avaliada. Ambos os vírus se mostraram presentes em múltipla infecção nos diferentes graus de lesão. Múltiplas infecções foram encontradas tanto em condilomas acuminados (8/69, 12%) quanto no câncer (2/12, 17%), mas, ao estratificar o grupo condiloma acuminado de acordo com os achados histopatológicos, observou-se que a lesão mais simples, verruga, possui uma prevalência de múltipla infecção pelo HPV-16 e HPV-6/11 de 6% (3/49), enquanto que a lesão mais grave, condiloma apresentou prevalência de 18% (5/27), 3 vezes maior. Apesar do pequeno número amostral, pode-se inferir e reforçar o que já se encontra descrito na literatura sobre o aumento da probabilidade de progressão de lesão na presença de múltiplas infecções.

Muitos são os estudos que avaliam a carga viral em amostras cervicais (CHEUNG *et al.*, 2006; CONSTANDINOU-WILLIAMS *et al.*, 2010; DONG *et al.*, 2018; FUXI *et al.*, 2017; SEGOND *et al.*, 2018; THOMSEN *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2018). Existem poucos trabalhos que avaliam a carga viral do HPV em homens, e estes diferem quanto ao tipo de amostra. Alguns avaliam a carga viral em amostras de condiloma acuminado (ANIC *et al.*, 2011; BALL *et al.*, 2011); outros, lesões anais (KREUTER *et al.*, 2007; DE MARRA *et al.*, 2017; UTAIPAT *et al.*, 2015); outros, amostras penianas (LIU *et al.*, 2018; SENKOMAGO *et al.*, 2016). Existem ainda variações quanto a forma de expressar os valores de carga viral (cópias/10.000

células; DNA/cópias, cópias/5000 células, cópias/célula, cópias por g de DNA celular, cópias virais/célula, \log_{10} cópias/ 10^5 células). Todas essas variações dificultam as comparações dos dados gerados nesse trabalho com os dados encontrados na literatura. Além disso, neste trabalho houve uma grande variabilidade entre os valores de carga viral no mesmo tipo de amostra, sendo que grande número de amostras seria necessário para obter análises estatísticas significativas. Essa variabilidade é relatada também em outros trabalhos (ALVAREZ *et al.*, 2010; BALL *et al.*, 2011; DO *et al.*, 2012; KREUTER *et al.*, 2007; UTAIPAT *et al.*, 2015;). Porém, o número amostral utilizado nesse trabalho, não difere dos estudos realizados em homens descritos na literatura (BALL *et al.*, 2011; BAYDAR *et al.*, 2013; da SILVA *et al.*, 2017; de LIMA ROCHA *et al.*, 2013; INGLES *et al.*, 2015; KALANTARI *et al.*, 2008; NIYA *et al.*, 2018; SUDENGA *et al.*, 2016).

Apesar destas variações, é consenso na literatura que lesões precursoras do câncer e o próprio câncer são resultado da ação carcinogênica de infecções persistentes por HPVs de alto risco e que altas cargas virais, além de dificultarem o *clearance* da infecção, encontram-se associadas à gravidade destas lesões (ALVAREZ *et al.*, 2010; BLEEKER *et al.*, 2006; DONG *et al.*, 2018; SALIT *et al.*, 2009; SCHMELER; STURGIS, 2016; SENKOMAGO *et al.*, 2016; UTAIPAT *et al.*, 2016). Existem poucos estudos sobre a influência da carga viral de HPVs de baixo risco neste processo carcinogênico e pouco se entende como estes vírus se comportam quando em múltipla infecção. Alguns trabalhos associam a presença de altas cargas virais de HPVs de baixo risco à ocorrência de lesão (COUTLÉE *et al.*, 2009; FORSLUND *et al.*, 2016).

Neste trabalho, as cargas virais do HPV-16 e HPV-6/11 foram avaliadas nas amostras de condiloma acuminado nos seus diferentes diagnósticos histopatológicos e nas amostras de câncer peniano, em presença ou ausência de múltiplas infecções.

Maior carga viral, tanto do HPV-16 quanto do HPV-6/11, foi encontrada nas amostras de condiloma quando comparadas às amostras de câncer peniano. A menor carga viral do HPV-16 em amostras de câncer era esperada e pode ser explicada pelo fenômeno da integração, que ao se completar, dá origem a um ciclo produtivo incompleto onde partículas virais não são mais formadas e a replicação se torna dependente da replicação celular (DOOBAR, 2005). No entanto, esperava-se também encontrar altas cargas virais do HPV-6/11, já que elas se encontram associadas à

presença e à gravidade das lesões, além de se tratar de um vírus que não se integra ao genoma do hospedeiro e não gerar um ciclo produtivo incompleto, mas altas cargas virais foram encontradas apenas nos condilomas acuminados e não no câncer peniano. Alguns trabalhos questionam a existência de uma possível competição entre diferentes tipos virais quando em múltipla infecção, outros relatam sinergismo, mas não há consenso na literatura sobre tal comportamento (BENNETTS *et al.*, 2015; CHATUVERDI *et al.*, 2011; SENAPATI *et al.*, 2017; VACCARELLA *et al.*, 2011).

Segundo Kadaja *et al.* (2007), o genoma do HPV integrado permanece ativo e disponível à replicação e transcrição, sendo controlado pelas proteínas E1 e E2, as quais são produzidas pela forma epissomal. O material genético integrado e assim duplicado pela ação de E1 e E2 produzidas pela forma epissomal, conterá o genoma do HPV integrado, como também as regiões flangeadoras, pertencentes ao genoma do hospedeiro, gerando um intermediário replicativo, ainda ligado ao genoma da célula hospedeira. Esse genoma amplificado será novamente integrado ao genoma do hospedeiro, aumentando assim o número de cópias virais e intensificando o processo de integração. Os autores chamaram este mecanismo de formação “de novo”.

De acordo com esta teoria, esperava-se encontrar nas amostras com múltipla infecção: 1) menores cargas virais do HPV-16 devido à sua integração; 2) que o HPV-16 estivesse, em sua maioria, integrado e não epissomal, sendo a replicação “de novo” mantida pelas proteínas E1 e E2 produzidas pelo HPV-6/11 que estaria com alta carga viral, pois ele não se integra e 3) agravamento da lesão.

Neste trabalho, nas amostras agrupadas em condiloma acuminado, uma maior carga viral do HPV-6/11 foi encontrada em amostras com diagnóstico histopatológico mais grave (Condiloma = mediana: 1990,97, IQ: 451,12 - 6864,39; Verruga = mediana: 1039,77, IQ: 469,22 - 2777,91; Papiloma = mediana: 395,90, IQ: 104,64 - 980,88) (Tabela 4), conforme esperado e em concordância com a literatura. Mas quando comparadas ao câncer, as cargas virais mostraram-se menores, conforme discutido acima.

A carga viral do HPV-16 mostrou-se mais alta na lesão com diagnóstico histopatológico de condiloma quando comparada às amostras com diagnóstico histopatológico de verruga, uma lesão mais leve (mediana: 175,01, IQ: 2,58 - 443,06; vs mediana: 3,56, IQ: 0,0009 - 918,96) e reduziu nas amostras de câncer peniano

(mediana: 0,02, IQ: 0,0007 - 81,33), comportamento também esperado e já discutido anteriormente (Tabela 5).

Quando se analisa as amostras com múltiplas infecções, a carga viral do HPV-6/11 é baixa nas amostras de verruga, uma lesão mais leve, aumenta quando a lesão se agrava e volta a reduzir no câncer (Verruga = mediana: 630,38, IQ: 305,20 - 1035,88; Condiloma = mediana 2130,36, IQ: 268,10 - 6799,17; Câncer peniano = mediana: 8,35) (Tabela 4). Acontece o mesmo quando se analisa a carga viral do HPV-16 (Verruga = mediana: 3,56, IQ: 0,0009 - 918,96; Condiloma = mediana: 175,01, IQ: 2,58 - 443,06; Câncer peniano = 0,24) (Tabela 5). Conforme descrito na literatura, altas cargas virais encontram-se associadas à presença e agravamento da lesão, entretanto, nas amostras de câncer a carga viral mostrou-se mais baixa, além da hipótese da existência de uma possível competição entre diferentes tipos virais em uma mesma infecção, vale ressaltar o pequeno número amostral do grupo câncer peniano ($n = 2$), o que impacta significativamente nesta análise.

Quando se compara o mesmo tipo de lesão, as amostras contendo múltiplas infecções apresentaram comportamento de carga viral do HPV-6/11 variável, menor carga viral quando em verruga (Verruga apenas HPV-6/11 = mediana: 1075,88, IQ: 490,17 - 2887,18 vs Verruga HPV- 6/11 + HPV-16 = mediana: 630,38, IQ: 305,20 - 1035,88) e maior carga viral quando em condiloma (Condiloma apenas HPV-6/11 = mediana: 1886,98, IQ: 424,75 - 7389,59 vs Condiloma HPV- 6/11 + HPV-16 = mediana: 2130,36, IQ: 268,10 - 6799,17) (Tabela 4). Esta observação gera o questionamento sobre a existência de uma possível competição entre os tipos virais e fortalece a hipótese de sinergismo resultando em lesões mais graves.

Quando as amostras de condiloma não são estratificadas de acordo com o diagnóstico histopatológico e apenas estratificadas quanto à presença ou ausência de múltipla infecção observa-se uma redução da carga viral do HPV-6/11 quando em múltipla infecção (mediana: 1075,88, IQ: 401,14 - 3535,96 vs mediana: 833,13, IQ: 353,22 - 3625,73). Já este resultado, por sua vez contradiz o anterior e sugere a existência de uma competição entre os diferentes tipos virais presentes na mesma lesão.

Quando se compara a carga viral do HPV-16 no câncer peniano em presença ou ausência de múltipla infecção com o HPV-6/11, observa-se um aumento da carga viral quando em múltipla infecção (Câncer peniano apenas HPV-16 = mediana 0,02, IQ: 0,0004 - 89,66 vs Câncer peniano HPV- 6/11 + HPV-16 = 0,24),

este achado também refuta a hipótese de competição dos tipos virais e fortalece a do sinergismo.

Essa controvérsia é também descrita na literatura (BALL *et al.*, 2011; COUPLÉE *et al.*, 2009; FORSLUND *et al.*, 2016) e o pequeno número amostral deste trabalho impediu uma análise mais conclusiva e nenhum dos testes estatísticos realizados mostrou diferença significativa entre os grupos. Portanto, segundo os dados apresentados, não se pode confirmar a hipótese de competição entre os diferentes tipos virais quando em múltipla infecção e nem avaliar sua influência no agravamento de lesões.

Apesar de também não ter sido encontrada diferença estatística entre as cargas virais do HPV-16 e 6/11 nas diferentes lesões (papiloma, verruga, condiloma e câncer), observa-se uma tendência de aumento da carga viral com o aumento da gravidade para ambos os tipos virais estudados. Estes resultados confirmam o que se encontra descrito na literatura (ALVAREZ *et al.*, 2010; BLEEKER *et al.*, 2006; COUPLÉE *et al.*, 2009; DONG *et al.*, 2018; FORSLUND *et al.*, 2016; SALIT *et al.*, 2009; SCHMELER E STURGIS, 2016; SENKOMAGO *et al.*, 2016; UTAIPAT *et al.*, 2016). A carga viral do HPV-16 apenas reduz nas amostras de câncer devido à integração (ARIAS-PULIDO *et al.*, 2006; DOOBAR *et al.*, 2012; de LIMA ROCHA, 2013).

A utilização de valores de carga viral como biomarcador tem sido questionada. Altas cargas virais foram encontradas em amostras com lesões leves e até mesmo sem alterações neoplásicas, também existem estudos que mostram progressão de lesões em presença de baixas cargas virais (FU XI *et al.*, 2011; LO *et al.*, 2005; MONNIER-BENOIT *et al.*, 2006). Por estes motivos, atualmente, a carga viral tem sido considerada apenas como um possível preditor de *clearance* de infecção e não marcador de evolução.

Em relação ao estado físico, dentre as 11 amostras de carcinoma positivas para o HPV-16, 73% (8/11) se apresentaram totalmente integradas e 27% (3/11) na forma mista, estes dados corroboram com a literatura onde integração do HPV-16 em amostras de câncer peniano variam de 73 a 100% (de LIMA ROCHA, 2013; DO *et al.*, 2012; KALANTARI *et al.*, 2008; ; NIYA *et al.*, 2018; TORNESELLO *et al.*, 1997).

A presença do HPV-16 foi verificada em 8 amostras de condiloma acuminado, mas seu estado físico foi determinado em 7. Uma das amostras não teve seu estado físico determinado devido à baixa carga viral. A maior parte destas

amostras encontrava-se sobre a forma mista (86%, 6/7) e apenas 1 amostra (14%) sob a forma epissomal.

Estes dados demonstram e corroboram com a literatura, onde a integração é considerada um fenômeno frequente em diferentes graus de lesões, não sendo determinante para o processo neoplásico, mas considerado um fator importante já que sua frequência aumenta com o agravamento da lesão.

Atualmente, o fenômeno de integração tem se mostrado muito importante no processo carcinogênico devido mais aos locais onde o DNA viral se integra e aos processos desencadeados a partir desta integração que pelo fenômeno em si. Alguns estudos recentes têm questionado se a quebra de E2 interfere tão significativamente na desregulação da expressão gênica das proteínas oncogênicas E6 e E7. Eles relatam evidências de diferentes padrões de expressão destas proteínas entre amostras de estado físico do HPV epissomal e integrada e que estes diferentes padrões de expressão se devem a processos pós-integração como a metilação, acetilação e outros. Estudos também têm apontado que os locais de integração também são muito importantes para o processo carcinogênico do HPV e frequentemente ocorrem naqueles genes que estão sendo constantemente expressos durante a transcrição e reparo do DNA. Portanto, a integração do HPV é proposta como uma mutação voltada para a progressão do câncer, não sendo dependente da super expressão de E6 e E7 apenas (GUO *et al.*, 2017; ROSENTHAL *et al.*, 2013; VEMULA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016).

Apenas 2 amostras de câncer peniano apresentaram múltipla infecção pelos HPV-16 e 6/11, uma delas estava sob a forma mista. Das amostras infectadas pelo HPV-16, na ausência do HPV-6/11 (9), 7 (78%) estavam totalmente integradas e 2 sob a forma mista. Observa-se uma tendência de integração em amostras onde o HPV-16 não se encontra em múltipla infecção com o HPV-6/11. Entretanto, chama-se atenção para o pequeno número amostral (11).

Ao se comparar a carga viral do HPV-16 aos diferentes estados físicos (epissomal, misto e integrado) tanto em amostras de condiloma acuminado quanto de câncer, uma diferença estatística foi encontrada ($p = 0,011$). Este achado corrobora com a literatura e é explicado pela implementação do ciclo produtivo incompleto descrito por Doobar (2005).

Foi encontrado apenas um trabalho avaliando o estado físico do HPV-16 em amostras de condiloma acuminado (de LIMA ROCHA, 2013), e os dados

corroboraram com os resultados encontrados neste trabalho, onde mesmo em amostras consideradas benignas o HPV-16 pode ter sido encontrado com algum grau de integração. Neste trabalho, a integração foi detectada em 90% dos pacientes infectados pelo HPV-16, em amostras de condiloma acuminado ou assintomáticos.

Altas cargas virais proporcionam níveis elevados de E1 e E2, maior intensidade de replicação e transcrição viral, o que, por consequência, gera o aparecimento de formas aberrantes, isto ameaça a estabilidade do genoma viral e pode ser considerado um dos possíveis gatilhos para a sua integração (DOOBAR *et al.*, 2012; KADAJA *et al.*, 2009; MANNIK *et al.*, 2002).

Neste trabalho, a maioria das amostras de câncer (8/11, 72%) estavam sobre a forma integrada e a maioria das amostras de condiloma (6/7) possuíam o DNA-HPV-16 sob a forma mista. Este resultado condiz com a literatura, já que a forma mista é considerada uma forma intermediária entre a epissomal, encontrada em lesões mais simples, e a integrada, frequente em lesões mais graves e cancerosas (KADAJA *et al.*, 2007). Não foi encontrada diferença significativa em relação a associação entre múltiplas infecções em condilomas acuminados e estado físico do genoma do HPV.

O método utilizado para determinar o estado físico do HPV neste trabalho foi determinando a razão E2/E6, o mesmo utilizado por vários pesquisadores na determinação do estado físico do HPV em diferentes amostras (CHOI *et al.*, 2018; KHANAL *et al.*, 2018; KLOPFER *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018; LORENZI *et al.*, 2017; MANAWAPAT-KLOPFER *et al.*, 2018; SZOSTEK *et al.*, 2017).

A presença de integração em pacientes assintomáticas ou com lesões de baixo grau, ou a presença das formas epissomais em lesões de baixo grau levaram ao questionamento do uso da integração viral como biomarcador (ALVAREZ *et al.*, 2010; KARBALAIE NIYA *et al.*, 2018).

O pequeno número amostral deste trabalho foi um forte limitador. São amostras raras e de difícil acesso, além disso, não é possível trabalhar com amostras muito antigas, pois o material genético encontra-se muito degradado devido ao tratamento com formaldeído e inclusão em parafina. O n amostral também reduz quando se busca múltiplas infecções que conforme Anic *et al.* (2011), em seu estudo multinacional em homens, detectou múltiplas infecções dos HPV-16 e 18 e HPV-6 e 11 em apenas 12,5% dos condilomas acuminados. O câncer peniano, por sua vez, além de ser uma doença rara, apenas metade é associada ao HPV.

Devido a esta limitação, este trabalho deve ser considerado apenas como descritivo, porém de grande importância na geração de conhecimento em uma literatura escassa. Mais estudos são necessários, principalmente no que diz respeito às múltiplas infecções e sua influência no processo de carcinogênese viral.

8 CONCLUSÕES

- A ampla variação da carga viral tanto do HPV-16 quanto do HPV-6/11, pode dificultar a utilização da carga viral como marcador no diagnóstico precoce do câncer peniano.
- A integração é um fenômeno frequente em diferentes amostras, com diferentes graus de gravidade de lesão.
- A integração é um fator importante para a carcinogênese viral, mas não determinante.
- Múltiplas infecções de vírus de alto risco e vírus de baixo risco em amostras de condiloma acuminado são frequentes. Sendo assim, a pesquisa de vírus de alto risco em amostras benignas é importante, a fim de entender sua influência e prevenir a progressão para o câncer.

9 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

- Ampliar o conhecimento sobre carga viral ao associá-la a biomarcadores como p16, MCM7, RAP1A e Ki-67.
- Avaliar a expressão de biomarcadores imunohistoquímicos e associar sua expressão à integração viral.
- Compreender a influência de múltiplas infecções no processo carcinogênico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAGI, K. *et al.* **Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability.** *Genome Res*, v. 24, n. 2, p. 185-99, Feb 2014. ISSN 1549-5469. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24201445> >.

ALI, H. *et al.* **Genital warts in young Australians five years into national human papillomavirus vaccination programme: national surveillance data.** *BMJ*, v. 346, p. f2032, Apr 2013. ISSN 1756-1833. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23599298> >.

ALVAREZ-ALDANA, A.; MARTÍNEZ, J. W.; SEPÚLVEDA-ARIAS, J. C. **Comparison of five protocols to extract DNA from paraffin-embedded tissues for the detection of human papillomavirus.** *Pathol Res Pract*, v. 211, n. 2, p. 150-5, Feb 2015. ISSN 1618-0631. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25444238> >.

ALVAREZ, J. *et al.* **Episomal and integrated human papillomavirus type 16 loads and anal intraepithelial neoplasia in HIV-seropositive men.** *AIDS*, v. 24, n. 15, p. 2355-63, Sep 2010. ISSN 1473-5571. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20706109> >.

ANDERSON, J. S. *et al.* **A randomized, placebo-controlled, dose-escalation study to determine the safety, tolerability, and immunogenicity of an HPV-16 therapeutic vaccine in HIV-positive participants with oncogenic HPV infection of the anus.** *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 52, n. 3, p. 371-81, Nov 2009. ISSN 1944-7884. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19661810> >.

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.** *J Infect Dis*, v. 204, n. 12, p. 1886-92, Dec 2011. ISSN 1537-6613. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013227> >.

ANIC, G. M. *et al.* **Risk factors for Incident condiloma in a multinational cohort of men: the HIM study.** *J Infect Diseases*, v. 205, n. 5, p. 789-793, Mar 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238467> >

ANTUNES, A. A.; DALL'OGGIO, M. F.; SROUGI, M. **Organ-sparing treatment for penile cancer.** *Nat Clin Pract Urol*, v. 4, n. 11, p. 596-604, Nov 2007. ISSN 1743-4289. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982436> >.

ARIAS-PULIDO, H. *et al.* **Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer.** J Clin Microbiol, v. 44, n. 5, p. 1755-62, May 2006. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672403> >.

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.; IONESCO, M.; BARRASSO, R. **Penile intraepithelial neoplasia. Specific clinical features correlate with histologic and virologic findings.** Cancer, v. 74, n. 6, p. 1762-7, Sep 1994. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8082079> >.

BALDWIN, S. B. *et al.* **Human papillomavirus infection in men attending a sexually transmitted disease clinic.** J Infect Dis, v. 187, n. 7, p. 1064-70, Apr 2003. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660920> >.

BALL, S. L. *et al.* **Analyses of human papillomavirus genotypes and viral loads in anogenital warts.** J Med Virol, v. 83, n. 8, p. 1345-50, Aug 2011. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21678438> >.

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

BENNETTS, L. E. *et al.* **Associations of Anogenital Low-Risk Human Papillomavirus Infection With Cancer and Acquisition of HIV.** Sex Transm Dis, v. 42, n. 10, p. 541-4, Oct 2015. ISSN 1537-4521. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26372925> >.

BETZ, S. J. **HPV-Related Papillary Lesions of the Oral Mucosa: A Review.** Head Neck Pathol, v. 13, n. 1, p. 80-90, Mar 2019. ISSN 1936-0568. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30693456> >.

BHATTACHARJEE, B.; SENGUPTA, S. **CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2.** Virology, v. 354, n. 2, p. 280-5, Oct 2006. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16905170> >.

BLEEKER, M. C. *et al.* **Flat penile lesions: the infectious "invisible" link in the transmission of human papillomavirus.** Int J Cancer, v. 119, n. 11, p. 2505-12,

Dec 2006. ISSN 0020-7136. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988942> >.

BLOMBERG, M. *et al.* **Genital warts and risk of cancer: a Danish study of nearly 50 000 patients with genital warts.** J Infect Dis, v. 205, n. 10, p. 1544-53, May 2012. ISSN 1537-6613. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427679> >.

BOON, M. E. *et al.* **Penile studies and heterosexual partners. Peniscopy, cytology, histology, and immunocytochemistry.** Cancer, v. 61, n. 8, p. 1652-9, Apr 1988. ISSN 0008-543X. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2450635> >.

BRADY, K. L.; MERCURIO, M. G.; BROWN, M. D. **Malignant tumors of the penis.** Dermatol Surg, v. 39, n. 4, p. 527-47, Apr 2013. ISSN 1524-4725. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23164051> >.

BRAVO, I. G.; FÉLEZ-SÁNCHEZ, M. **Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine.** Evol Med Public Health, v. 2015, n. 1, p. 32-51, Jan 2015. ISSN 2050-6201. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25634317> >.

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, Mar 2001. ISSN 0042-6822. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222093> >.

BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. **Human papillomavirus genome variants.** Virology, v. 445, n. 1-2, p. 232-43, Oct 2013. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23998342> >.

CAI, Q. *et al.* **Human papillomavirus early proteins and apoptosis.** Arch Gynecol Obstet, v. 287, n. 3, p. 541-8, Mar 2013. ISSN 1432-0711. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23263171> >.

CHAIWONGKOT, A. *et al.* **Evaluation of primers and PCR performance on HPV DNA screening in normal and low grade abnormal cervical cells.** Asian Pac J Cancer Prev, v. 8, n. 2, p. 279-82, 2007 Apr-Jun 2007. ISSN 1513-7368. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17696746> >.

CHAIWONGKOT, A. *et al.* **Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical**

lesions. Int J Cancer, v. 132, n. 9, p. 2087-94, May 2013. ISSN 1097-0215.
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23065631> >.

CHAN, M. P. **Verruciform and Condyloma-like Squamous Proliferations in the Anogenital Region.** Arch Pathol Lab Med, Sep 2018. ISSN 1543-2165. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30203987> >.

CHAN, P. K. *et al.* **Distribution of human papillomavirus types in anogenital warts of men.** J Clin Virol, v. 44, n. 2, p. 111-4, Feb 2009. ISSN 1873-5967.
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19097933> >.

CHAN, S. L. *et al.* **Dermatoscopic findings of penile intraepithelial neoplasia: Bowenoid papulosis, Bowen disease and erythroplasia of Queyrat.** Australas J Dermatol, Dec 2018. ISSN 1440-0960. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30585302> >.

CHATURVEDI, A. K. *et al.* **Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease.** J Infect Dis, v. 203, n. 7, p. 910-20, Apr 2011. ISSN 1537-6613. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21402543> >.

CHAUX, A. **Distribution and characterization of subtypes of penile intraepithelial neoplasia and their association with invasive carcinomas: a pathological study of 139 lesions in 121 patients.** Hum Pathol, v. 43, n. 7, p. 1020-7, Jul 2012. ISSN 1532-8392. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22169255> >.

CHEN, X. *et al.* **HPV16 DNA and integration in normal and malignant epithelium: implications for the etiology of laryngeal squamous cell carcinoma.** Ann Oncol, v. 28, n. 5, p. 1105-1110, 05 2017. ISSN 1569-8041. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28327951> >.

CHENG, S. H. *et al.* **Multiple types of human papillomavirus infection and anal precancerous lesions in HIV-infected men in Taiwan: a cross-sectional study.** BMJ Open, v. 8, n. 1, p. e019894, 01 2018. ISSN 2044-6055. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29374678> >.

CHEUNG, J. L. *et al.* **Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia.** J Infect Dis, v. 194, n. 12, p. 1706-12, Dec 2006. ISSN 0022-1899. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109343> >.

CHO, C. Y. *et al.* **Risk of cancer in patients with genital warts: A nationwide, population-based cohort study in Taiwan.** PLoS One, v. 12, n. 8, p. e0183183, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28806741> >.

CHOI, Y. J. *et al.* **E2/E6 ratio and L1 immunoreactivity as biomarkers to determine HPV16-positive high-grade squamous intraepithelial lesions (CIN2 and 3) and cervical squamous cell carcinoma.** J Gynecol Oncol, v. 29, n. 3, p. e38, May 2018. ISSN 2005-0399. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29400024> >.

CHONDROS, K. *et al.* **Extensive anogenital warts: a multidisciplinary surgical management.** Pan Afr Med J, v. 30, p. 227, 2018. ISSN 1937-8688. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30574245> >.

CHOO, K. B.; PAN, C. C.; HAN, S. H. **Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames.** Virology, v. 161, n. 1, p. 259-61, Nov 1987. ISSN 0042-6822. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2823467> >.

CHOW, L. T.; BROKER, T. R.; STEINBERG, B. M. **The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia.** APMIS, v. 118, n. 6-7, p. 422-49, Jun 2010. ISSN 1600-0463. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553526> >.

CHRISTODOULIDOU, M. *et al.* **Epidemiology of penile cancer.** Curr Probl Cancer, v. 39, n. 3, p. 126-36, 2015 May-Jun 2015. ISSN 1535-6345. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26076979> >.

CLARKE, M. A.; WENTZENSEN, N. **Strategies for screening and early detection of anal cancers: A narrative and systematic review and meta-analysis of cytology, HPV testing, and other biomarkers.** Cancer Cytopathol, v. 126, n. 7, p. 447-460, Jul 2018. ISSN 1934-6638. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29797691> >.

CONSTANDINO-WILLIAMS *et al.* **Is human papillomavirus viral load a clinically useful predictive marker? A longitudinal study.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v. 19, n. 3, p. 832-837, 2010.

CORNALL, A. M. *et al.* **Anal and perianal squamous carcinomas and high-grade intraepithelial lesions exclusively associated with "low-risk" HPV genotypes 6**

and 11. *Int J Cancer*, v. 133, n. 9, p. 2253-8, Nov 2013. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23616200> >.

COSTA-SILVA, M. *et al.* **Anogenital warts in pediatric population.** *An Bras Dermatol*, v. 92, n. 5, p. 675-681, 2017 Sep-Oct 2017. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29166505> >.

COUtlÉE, F. *et al.* **Low-risk human papillomavirus type 6 DNA load and integration in cervical samples from women with squamous intraepithelial lesions.** *J Clin Virol*, v. 45, n. 2, p. 96-9, Jun 2009. ISSN 1873-5967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19398216> >.

COUTO, T. C. *et al.* **Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two reference centers.** *Int Braz J Urol*, v. 40, n. 6, p. 738-44, 2014 *apud* DOUGLAWI, A.; MASTERSON, T. A. **Updates on the epidemiology and risk factors for penile cancer.** *Transl Androl Urol*, v. 6, n. 5, p. 785-790, Oct 2017. ISSN 2223-4691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29184774> >.

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.** *Gynecol Oncol*, v. 106, n. 3, p. 549-57, Sep 2007. ISSN 0090-8258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568661> >.

CRICCA, M. *et al.* **Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions.** *J Virol Methods*, v. 158, n. 1-2, p. 180-3, Jun 2009. ISSN 1879-0984. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19187786> >.

CUBILLA, A. L. *et al.* **Value of p16(INK)⁴(a) in the pathology of invasive penile squamous cell carcinomas: A report of 202 cases.** *Am J Surg Pathol*, v. 35, n. 2, p. 253-61, Feb 2011. ISSN 1532-0979. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21263246> >.

CUBILLA, A. L. **The World Health Organisation 2016 classification of penile carcinomas: a review and update from the International Society of Urological Pathology expert-driven recommendations.** *Histopathology*, v. 72, n. 6, p. 893-904, May 2018. ISSN 1365-2559. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29105175> >.

CUBILLA, A. L.; VELAZQUEZ, E. F.; YOUNG, R. H. **Epithelial lesions associated with invasive penile squamous cell carcinoma: a pathologic study of 288 cases.** *Int J Surg Pathol*, v. 12, n. 4, p. 351-64, Oct 2004. ISSN 1066-8969. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494861> >.

DA SILVA, R. J. C. *et al.* **HPV-related external genital lesions among men residing in Brazil**. Braz J Infect Dis, v. 21, n. 4, p. 376-385, 2017 Jul - Aug 2017. ISSN 1678-4391. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28399426> >.

DALING, J. R. *et al.* **Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease**. Int J Cancer, v. 116, n. 4, p. 606-16, Sep 2005. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15825185> >.

DALL, K. L. *et al.* **Characterization of naturally occurring HPV16 integration sites isolated from cervical keratinocytes under noncompetitive conditions**. Cancer Res, v. 68, n. 20, p. 8249-59, Oct 2008. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18922896> >.

DAVIS, K. G.; ORANGIO, G. R. **Basic Science, Epidemiology, and Screening for Anal Intraepithelial Neoplasia and Its Relationship to Anal Squamous Cell Cancer**. Clin Colon Rectal Surg, v. 31, n. 6, p. 368-378, Nov 2018. ISSN 1531-0043. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30397396> >.

DEDHIA, P. *et al.* **Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues**. Asian Pac J Cancer Prev, v. 8, n. 1, p. 55-9, 2007 Jan-Mar 2007. ISSN 1513-7368. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17477772> >

DE LIMA ROCHA, 2013. **Análise da carga viral e do estado físico do DNA-HPV 16 em amostras penianas**. Orientador: Ana Paula Salles Moura Fernandes. 2013. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013).

DE LIMA ROCHA, M. G. *et al.* **Detection of human papillomavirus infection in penile samples through liquid-based cytology and polymerase chain reaction**. Cancer, v. 114, n. 6, p. 489-93, Dec 2008. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18973183> >.

DE MARTEL, C. *et al.* **Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type**. Int J Cancer, v. 141, n. 4, p. 664-670, 08 2017. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28369882> >.

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. J Gen Virol, v. 76 (Pt 4), p. 1057-62, Apr 1995. ISSN 0022-1317. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9049358> >.

DE SANJOSÉ, S.; BROTONS, M.; PAVÓN, M. A. **The natural history of human papillomavirus infection.** Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, v. 47, p. 2-13, Feb 2018. ISSN 1532-1932. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28964706> >.

DE VILLIERS, E. M. **Cross-roads in the classification of papillomaviruses.** Virology, v. 445, n. 1-2, p. 2-10, Oct 2013. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23683837> >.

DEEN, K.; BURDON-JONES, D. **Imiquimod in the treatment of penile intraepithelial neoplasia: An update.** Australas J Dermatol, v. 58, n. 2, p. 86-92, May 2017. ISSN 1440-0960. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26952903> >.

DICKSON, E. L. *et al.* **Cervical cytology and multiple type HPV infection: a study of 8182 women ages 31-65.** Gynecol Oncol, v. 133, n. 3, p. 405-8, Jun 2014. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24657488> >.

DO, H. T. *et al.* **The etiologic role of human papillomavirus in penile cancers: a study in Vietnam.** Br J Cancer, v. 108, n. 1, p. 229-33, Jan 2013. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23299525> >.

DOMENECH-VIÑOLAS, M. *et al.* **Incidence, psychosocial burden, and economic impact of genital warts in Mexico.** Salud Publica Mex, v. 60, n. 6, p. 624-632, 2018 Nov-Dic 2018. ISSN 1606-7916. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30699267> >.

DONG, B. *et al.* **Type-specific high-risk human papillomavirus viral load as a viable triage indicator for high-grade squamous intraepithelial lesion: a nested case- control study.** Cancer Manag Res, v. 10, p. 4839-4851, 2018. ISSN 1179-1322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30425576> >.

DOORBAR, J. **The papillomavirus life cycle.** J Clin Virol, v. 32 Suppl 1, p. S7-15, Mar 2005. ISSN 1386-6532. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753007> >.

DOORBAR, J. *et al.* **The biology and life-cycle of human papillomaviruses.** *Vaccine*, v. 30 Suppl 5, p. F55-70, Nov 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199966> >.

DOUGLAWI, A.; MASTERSON, T. A. **Updates on the epidemiology and risk factors for penile cancer.** *Transl Androl Urol*, v. 6, n. 5, p. 785-790, Oct 2017. ISSN 2223-4691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29184774> >.

DOWNES, M. R. **Review of in situ and invasive penile squamous cell carcinoma and associated non-neoplastic dermatological conditions.** *J Clin Pathol*, v. 68, n. 5, p. 333-40, May 2015. ISSN 1472-4146. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25883161> >.

EAGLSTEIN, W. H.; WEINSTEIN, G. D.; FROST, P. **Fluorouracil: mechanism of action in human skin and actinic keratoses. I. Effect on DNA synthesis in vivo.** *Arch Dermatol*, v. 101, n. 2, p. 132-9, Feb 1970 *apud* MANJUNATH, A. *et al.* **Topical Therapy for non-invasive penile cancer (Tis)-updated results and toxicity.** *Transl Androl Urol*, v. 6, n. 5, p. 803-808, Oct 2017. ISSN 2223-4691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29184776> >.

EGAWA, N.; DOORBAR, J. **The low-risk papillomaviruses.** *Virus Res*, v. 231, p. 119-127, 03 2017. ISSN 1872-7492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28040475> >.

EL AWADY, M. K. *et al.* **Molecular analysis of integrated human papillomavirus 16 sequences in the cervical cancer cell line SiHa.** *Virology*, v. 159, n. 2, p. 389-98, Aug 1987. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3039733> >.

EVERSOLE, L. R. **Papillary lesions of the oral cavity: relationship to human papillomaviruses.** *J Calif Dent Assoc*, v. 28, n. 12, p. 922-7, Dec 2000. ISSN 1043-2256. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11323946> >.

FAVORITO, L. A. *et al.* **Epidemiologic study on penile cancer in Brazil.** *Int Braz J Urol*, v. 34, n. 5, p. 587-91; discussion 591-3, 2008 Sep-Oct 2008. ISSN 1677-6119. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18986562> >.

FERENCZY, A. **Epidemiology and clinical pathophysiology of condylomata acuminata.** *Am J Obstet Gynecol*, v. 172, n. 4 Pt 2, p. 1331-9, Apr 1995. ISSN 0002-9378. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7726289> >.

FERNANDEZ, A. F. *et al.* **The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer.** *Genome Res*, v. 19, n. 3, p. 438-51, Mar 2009. ISSN 1088-9051. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208682> >.

FERNÁNDEZ-NESTOSA, M. J. *et al.* **Human Papillomavirus (HPV) Genotypes in Condylomas, Intraepithelial Neoplasia, and Invasive Carcinoma of the Penis Using Laser Capture Microdissection (LCM)-PCR: A Study of 191 Lesions in 43 Patients.** *Am J Surg Pathol*, v. 41, n. 6, p. 820-832, Jun 2017. ISSN 1532-0979. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28486384> >.

FILHO, S. M. A. *et al.* **Methylation at 3'LCR of HPV16 can be affected by patient age and disruption of E1 or E2 genes.** *Virus Res*, v. 232, p. 48-53, 03 2017. ISSN 1872-7492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28143725> >.

FORSLUND, O. *et al.* **Viral load and mRNA expression of HPV type 6 among cases with recurrent respiratory papillomatosis.** *Laryngoscope*, v. 126, n. 1, p. 122-7, Jan 2016. ISSN 1531-4995. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26010342> >.

FU XI, L. *et al.* **Type-dependent association between risk of cervical intraepithelial neoplasia and viral load of oncogenic human papillomavirus types other than types 16 and 18.** *Int J Cancer*, v. 140, n. 8, p. 1747-1756, 04 2017. ISSN 1097-0215. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28052328> >.

GIULIANO, A. R. *et al.* **Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study.** *Lancet*, v. 377, n. 9769, p. 932-40, Mar 2011. ISSN 1474-547X. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21367446> >.

GIULIANO, A. R. *et al.* **Genital Wart Recurrence Among Men Residing in Brazil, Mexico, and the United States.** *J Infect Dis*, v. 219, n. 5, p. 703-710, Feb 2019. ISSN 1537-6613. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30388232> >.

GIULIANO, A. R. *et al.* **Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions.** *Vaccine*, v. 26 Suppl 10, p. K17-28, Aug 2008. ISSN 0264-410X. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18847554> >.

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. 249-56, 2012. ISSN 1874-3579. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23341860> >.

GRAHAM, S. V. **The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review.** Clin Sci (Lond), v. 131, n. 17, p. 2201-2221, Sep 2017. ISSN 1470-8736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28798073> >.

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, n. 1-2, p. 23-33, Sep 2003. ISSN 0166-0934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12951209> >.

GRAY, R. H. *et al.* **Male circumcision decreases acquisition and increases clearance of high-risk human papillomavirus in HIV-negative men: a randomized trial in Rakai, Uganda.** J Infect Dis, v. 201, n. 10, p. 1455-62, May 2010. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20370483> >.

GRCE, M. *et al.* **Detection and typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction in cervical scrapes of Croatian women with abnormal cytology.** Eur J Epidemiol, v. 13, n. 6, p. 645-51, Sep 1997. ISSN 0393-2990. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9324210> >.

GROSS, G.; PFISTER, H. **Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts.** Med Microbiol Immunol, v. 193, n. 1, p. 35-44, Feb 2004. ISSN 0300-8584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838415> >.

GUIDRY, J. T.; SCOTT, R. S. **The interaction between human papillomavirus and other viruses.** Virus Res, v. 231, p. 139-147, 03 2017. ISSN 1872-7492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27826043> >.

GUIMERA, N. *et al.* **The occasional role of low-risk human papillomaviruses 6, 11, 42, 44, and 70 in anogenital carcinoma defined by laser capture microdissection/PCR methodology: results from a global study.** Am J Surg Pathol, v. 37, n. 9, p. 1299-310, Sep 2013. ISSN 1532-0979. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24076770> >.

GUO, K. *et al.* **The expression pattern of long non-coding RNA PVT1 in tumor tissues and in extracellular vesicles of colorectal cancer correlates with cancer progression.** *Tumour Biol*, v. 39, n. 4, p. 1010428317699122, Apr 2017. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28381186> >.

HAGIWARA, K. *et al.* **A genotype distribution of human papillomaviruses detected by polymerase chain reaction and direct sequencing analysis in a large sample of common warts in Japan.** *J Med Virol*, v. 77, n. 1, p. 107-12, Sep 2005. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16032719> >.

HAJIA, M.; SOHRABI, A. **Possible Synergistic Interactions Among Multiple HPV Genotypes in Women Suffering from Genital Neoplasia.** *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 19, n. 3, p. 785-789, Mar 2018. ISSN 2476-762X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29582635> >.

HAWKINS, M. G. *et al.* **Detection of specific HPV subtypes responsible for the pathogenesis of condylomata acuminata.** *Virol J*, v. 10, p. 137, May 2013. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23634957> >.

HERFS, M. *et al.* **A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 109, n. 26, p. 10516-21, Jun 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22689991> >.

HO, C. M. *et al.* **Integration of human papillomavirus correlates with high levels of viral oncogene transcripts in cervical carcinogenesis.** *Virus Res*, v. 161, n. 2, p. 124-30, Nov 2011. ISSN 1872-7492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21777630> >.

HO, G. Y. *et al.* **Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women.** *N Engl J Med*, v. 338, n. 7, p. 423-8, Feb 1998. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9459645> >.

HONG, D. *et al.* **Viral E6 is overexpressed via high viral load in invasive cervical cancer with episomal HPV16.** *BMC Cancer*, v. 17, n. 1, p. 136, Feb 15 2017. ISSN 1471-2407 (Electronic) 1471-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28202002> >.

HOWIE, H. L.; KATZENELLENBOGEN, R. A.; GALLOWAY, D. A. **Papillomavirus E6 proteins.** *Virology*, v. 384, n. 2, p. 324-34, Feb 2009. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19081593> >.

HUIJSMANS, C. J. *et al.* **Comparative analysis of four methods to extract DNA from paraffin-embedded tissues: effect on downstream molecular applications.** BMC Res Notes, v. 3, p. 239, Sep 2010. ISSN 1756-0500. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20840759> >.

HU, Z., ZHU, D., WANG, W., LI, W., JIA, W., ZENG, X., *et al.*, 2015. **Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism.** Nat. Genet. 47 (2), 158–163. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3178>. (Epub 2015/01/13. PubMed PMID: 25581428).

INGLES, D. J. *et al.* **Human papillomavirus virus (HPV) genotype- and age-specific analyses of external genital lesions among men in the HPV Infection in Men (HIM) Study.** J Infect Dis, v. 211, n. 7, p. 1060-7, Apr 2015. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25344518> >.

KADAJA, M. *et al.* **Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses.** PLoS Pathog, v. 5, n. 4, p. e1000397, Apr 2009. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19390600> >.

KADAJA, M. *et al.* **Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery.** EMBO J, v. 26, n. 8, p. 2180-91, Apr 2007. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17396148> >.

KAHLA, S. *et al.* **HPV-16 E2 physical status and molecular evolution in vivo in cervical carcinomas.** Int J Biol Markers, v. 29, n. 1, p. e78-85, Mar 2014a. ISSN 1724-6008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24170557> >.

KAHLA, S. *et al.* **Situation of HPV16 E2 gene status during radiotherapy treatment of cervical carcinoma.** Asian Pac J Cancer Prev, v. 15, n. 6, p. 2869-73, 2014b. ISSN 2476-762X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24761916> >.

KALANTARI, M. *et al.* **Human papillomavirus-16 and -18 in penile carcinomas: DNA methylation, chromosomal recombination and genomic variation.** Int J Cancer, v. 123, n. 8, p. 1832-40, Oct 2008. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688866> >.

KALIFF, M. *et al.* **Findings of multiple HPV genotypes in cervical carcinoma are associated with poor cancer-specific survival in a Swedish cohort of cervical cancer primarily treated with radiotherapy.** *Oncotarget*, v. 9, n. 27, p. 18786-18796, Apr 2018. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29721161> >.

KARBALAIE NIYA, M. H. *et al.* **Human Papillomavirus Type 16 Integration Analysis by Real-time PCR Assay in Associated Cancers.** *Transl Oncol*, v. 11, n. 3, p. 593-598, Jun 2018. ISSN 1936-5233. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29547758> >.

KATELARIS, P. M. *et al.* **Human papillomavirus: the untreated male reservoir.** *J Urol*, v. 140, n. 2, p. 300-5, Aug 1988. ISSN 0022-5347. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2456403> >.

HELEN; MAYAUD; DE SANJOSE. **Concomitant Infection of HIV and HPV: What Are the Consequences?** *Curr Obstet Gynecol*. 2015. ISSN 2161-3303. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s13669-015-0132-0>>

KHANAL, S. *et al.* **Viral DNA integration and methylation of human papillomavirus type 16 in high-grade oral epithelial dysplasia and head and neck squamous cell carcinoma.** *Oncotarget*, v. 9, n. 54, p. 30419-30433, Jul 2018. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30100997> >.

KISELEVA, V. I. *et al.* **[The significance of physical status of human papillomavirus type 16 for predicting the effectiveness of invasive cervical cancer treatment].** *Vopr Onkol*, v. 59, n. 6, p. 756-60, 2013. ISSN 0507-3758. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24624787> >.

KLETER, B. *et al.* **Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses.** *Am J Pathol*, v. 153, n. 6, p. 1731-9, Dec 1998. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9846964> >.

KORBELIK, M. **Cancer vaccines generated by photodynamic therapy.** *Photochem Photobiol Sci*, v. 10, n. 5, p. 664-9, May 2011. ISSN 1474-9092. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21258728> >.

KORZENIOWSKI, M. A.; CROOK, J. M. **Contemporary role of radiotherapy in the management of penile cancer.** *Transl Androl Urol*, v. 6, n. 5, p. 855-867, Oct 2017.

ISSN 2223-4691. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29184783> >.

KREUTER, A. *et al.* **High-grade Dysplasia in Anogenital Warts of HIV-Positive Men.** JAMA Dermatol, v. 152, n. 11, p. 1225-1230, 11 2016. ISSN 2168-6084. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27463201> >.

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.** Br J Dermatol, v. 157, n. 3, p. 523-30, Sep 2007. ISSN 0007-0963. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17573882> >.

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

KUMAR, P. *et al.* **Atypical morphology of anogenital warts is not a marker of atypical histology or of infection to the high-risk human papillomavirus genotypes.** Int J Dermatol, v. 56, n. 10, p. 1017-1021, Oct 2017. ISSN 1365-4632. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28741750> >.

LACEY, C. J. *et al.* **2012 European guideline for the management of anogenital warts.** J Eur Acad Dermatol Venereol, v. 27, n. 3, p. e263-70, Mar 2013. ISSN 1468-3083. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22409368> >.

LAZCANO-PONCE, E. *et al.* **Incidence of external genital lesions related to human papillomavirus among Mexican men. A cohort study.** Salud Publica Mex, v. 60, n. 6, p. 633-644, 2018 Nov-Dic 2018. ISSN 1606-7916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30699268> >.

LEHMANN, U.; KREIPE, H. **Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies.** Methods, v. 25, n. 4, p. 409-18, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846610> >.

LESNIKOVA, I. *et al.* **Rapid, sensitive, type specific PCR detection of the E7 region of human papillomavirus type 16 and 18 from paraffin embedded sections of cervical carcinoma.** Infect Agent Cancer, v. 5, p. 2, Jan 2010. ISSN 1750-9378. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20180999> >.

LEYVA, A.; KELLEY, W. N. **Measurement of DNA in cultured human cells.** Anal Biochem, v. 62, n. 1, p. 173-9, Nov 1974. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4473914> >.

LI, S. *et al.* **Prevalence of the integration status for human papillomavirus 16 in esophageal carcinoma samples.** Turk J Gastroenterol, v. 29, n. 2, p. 157-163, 03 2018. ISSN 2148-5607. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29749321> >.

LIU, M. *et al.* **Viral Load in the Natural History of Human Papillomavirus Infection Among Men in Rural China: A Population-based Prospective Study.** Clin Infect Dis, v. 67, n. 12, p. 1861-1867, Nov 2018. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29961890> >.

LORENZI, A. *et al.* **Physical state and copy numbers of HPV16 in oral asymptomatic infections that persisted or cleared during the 6-year follow-up.** J Gen Virol, v. 98, n. 4, p. 681-689, Apr 2017. ISSN 1465-2099. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28100295> >.

LÖWHAGEN, G. B. *et al.* **The prevalence of "high-risk" HPV types in penile condyloma-like lesions: correlation between HPV type and morphology.** Genitourin Med, v. 69, n. 2, p. 87-90, Apr 1993. ISSN 0266-4348. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8389724> >.

MANAWAPAT, A. *et al.* **Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study.** Am J Cancer Res, v. 2, n. 2, p. 192-203, 2012. ISSN 2156-6976 (Electronic) 2156-6976 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22432058> >.

MANAWAPAT-KLOPFER, A. *et al.* **HPV16 viral load and physical state measurement as a potential immediate triage strategy for HR-HPV-infected women: a study in 644 women with single HPV16 infections.** Am J Cancer Res, v. 8, n. 4, p. 715-722, 2018. ISSN 2156-6976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29736316> >.

MANN, L. M. *et al.* **Trends of Anogenital Warts Among Sexually Transmitted Disease Clinic Patients - Sexually Transmitted Disease Surveillance Network, United States, 2010-2016.** J Infect Dis, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30500908>>

MARKS, M. *et al.* **Kinetics of DNA load predict HPV 16 viral clearance.** J Clin Virol, v. 51, n. 1, p. 44-9, May 2011. ISSN 1873-5967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21388867> >.

MARRA, E. *et al.* **Anal HPV 16 and 18 viral load: A comparison between HIV-negative and -positive MSM and association with persistence.** J Med Virol, v. 90, n. 1, p. 76-83, 01 2018. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28700080> >.

MATOVINA, M. *et al.* **Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions.** Gynecol Oncol, v. 113, n. 1, p. 120-7, Apr 2009. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19157528> >.

MBULAWA, Z. Z. *et al.* **Impact of human immunodeficiency virus on the natural history of human papillomavirus genital infection in South African men and women.** J Infect Dis, v. 206, n. 1, p. 15-27, Jul 2012. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22517913> >.

MCBRIDE, A. A.; WARBURTON, A. **The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers.** PLoS Pathog, v. 13, n. 4, p. e1006211, 04 2017. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28384274> >.

MICALI, G. *et al.* **Topical pharmacotherapy for skin cancer: part I. Pharmacology.** J Am Acad Dermatol, v. 70, n. 6, p. 965.e1-12; quiz 977-8, Jun 2014. ISSN 1097-6787. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24831324> >.

MISRA, S.; CHATURVEDI, A.; MISRA, N. C. **Penile carcinoma: a challenge for the developing world.** Lancet Oncol, v. 5, n. 4, p. 240-7, Apr 2004. ISSN 1470-2045. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050955> >.

MITRA, A. *et al.* **The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next?** Microbiome, v. 4, n. 1, p. 58, 11 2016. ISSN 2049-2618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27802830> >.

MOSCONI, A. M. *et al.* **Cancer of the penis.** Crit Rev Oncol Hematol, v. 53, n. 2, p. 165-77, Feb 2005 *apud* DOUGLAWI, A.; MASTERSON, T. A. **Updates on the epidemiology and risk factors for penile cancer.** Transl Androl Urol, v. 6, n. 5, p.

785-790, Oct 2017. ISSN 2223-4691. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29184774> >.

MUNAGALA, R. *et al.* **Significance of multiple HPV infection in cervical cancer patients and its impact on treatment response.** Int J Oncol, v. 34, n. 1, p. 263-71, Jan 2009. ISSN 1019-6439. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19082497> >.

NATUNEN, K. *et al.* **Aspects of prophylactic vaccination against cervical cancer and other human papillomavirus-related cancers in developing countries.** Infect Dis Obstet Gynecol, v. 2011, p. 675858, 2011. ISSN 1098-0997. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785556> >.

NGUYEN, C. L.; MÜNGER, K. **Human papillomavirus E7 protein deregulates mitosis via an association with nuclear mitotic apparatus protein 1.** J Virol, v. 83, n. 4, p. 1700-7, Feb 2009. ISSN 1098-5514. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19052088> >.

NICOLAU, S. M. *et al.* **Importance of peniscopy, oncologic cytology and histopathology in the diagnosis of penile infection by human papillomavirus.** Med J., v 115, p. 1330-1335, 1997.

NUOVO, G. J. *et al.* **Correlation of histology and human papillomavirus DNA detection in condyloma acuminatum and condyloma-like vulvar lesions.** Am J Surg Pathol, v. 13, n. 8, p. 700-6, Aug 1989. ISSN 0147-5185. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2546460> >.

OJESINA, A. I. *et al.* **Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas.** Nature, v. 506, n. 7488, p. 371-5, Feb 2014. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24390348> >.

OLESEN, T. B. *et al.* **Prevalence of human papillomavirus DNA and p16.** Lancet Oncol, Dec 2018. ISSN 1474-5488. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30573285> >.

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, n. 2, p. 183-91, Apr 2010. ISSN 1471-6348. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392322> >.

PALEFSKY, J. M. **HPV infection in men.** Dis Markers, v. 23, n. 4, p. 261-72, 2007 *apud* PEDER, L. D. *et al.* **Association between Human Papillomavirus and Non-cervical Genital Cancers in Brazil: A Systematic Review and Meta-Analysis.** Asian Pac J Cancer Prev, v. 19, n. 9, p. 2359-2371, Sep 2018. ISSN 2476-762X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30255688> >.

PALEFSKY, J. M.; RUBIN, M. **The epidemiology of anal human papillomavirus and related neoplasia.** Obstet Gynecol Clin North Am, v. 36, n. 1, p. 187-200, Mar 2009. ISSN 1558-0474. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19344856> >.

PARK, I. U.; INTROCASO, C.; DUNNE, E. F. **Human Papillomavirus and Genital Warts: A Review of the Evidence for the 2015 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines.** Clin Infect Dis, v. 61 Suppl 8, p. S849-55, Dec 2015. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26602622> >.

PARKIN, D. M. *et al.* **Burden and trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the latin america and Caribbean region.** Vaccine, v. 26 Suppl 11, p. L1-15, Aug 2008. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945399> >.

PATEL, H. *et al.* **Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts.** BMC Infect Dis, v. 13, p. 39, Jan 2013. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23347441> >.

PLUMMER, M. *et al.* **Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis.** Lancet Glob Health, v. 4, n. 9, p. e609-16, 09 2016. ISSN 2214-109X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27470177> >.

POW-SANG, M. R. *et al.* **Epidemiology and natural history of penile cancer.** Urology, v. 76, n. 2 Suppl 1, p. S2-6, Aug 2010. ISSN 1527-9995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20691882> >.

PSYRRI, A.; DIMAIO, D. **Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer.** Nat Clin Pract Oncol, v. 5, n. 1, p. 24-31, Jan 2008. ISSN 1743-4262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18097454> >.

RENAUD-VILMER, C. *et al.* **Analysis of alterations adjacent to invasive squamous cell carcinoma of the penis and their relationship with associated carcinoma.** J Am Acad Dermatol, v. 62, n. 2, p. 284-90, Feb 2010. ISSN 1097-6787. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20115951> >.

RODNEY; ARYA; MUNEEER. **Is the incidence of penile carcinoma in situ increasing in England and the rest of Europe?** *Eur Urol Suppl*, v. 16, n. 3, p. e1224–e1225, March 2017. Disponível em: <[https://www.eusupplements.europeanurology.com/article/S1569-9056\(17\)30762-5/pdf](https://www.eusupplements.europeanurology.com/article/S1569-9056(17)30762-5/pdf)>.

ROSENTHAL, F. *et al.* **Macrodomain-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases.** *Nat Struct Mol Biol*, v. 20, n. 4, p. 502-7, Apr 2013. ISSN 1545-9985. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23474714>>.

ROVELLI, C. *et al.* **Presence of multiple genotypes in subjects with HPV-16 infection is highly associated with anal squamous intraepithelial lesions in HIV-1 infected males.** *PLoS One*, v. 12, n. 10, p. e0186367, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29088236>>.

RUBIN, M. A. *et al.* **Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis.** *Am J Pathol*, v. 159, n. 4, p. 1211-8, Oct 2001. ISSN 0002-9440. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583947>>.

RUSAN, M.; LI, Y. Y.; HAMMERMAN, P. S. **Genomic landscape of human papillomavirus-associated cancers.** *Clin Cancer Res*, v. 21, n. 9, p. 2009-19, May 2015. ISSN 1078-0432. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25779941>>.

SAFI, F. *et al.* **Management of peri-anal giant condyloma acuminatum--a case report and literature review.** *Asian J Surg*, v. 36, n. 1, p. 43-52, Jan 2013. ISSN 0219-3108. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23270825>>.

SAIKI, R. K. *et al.* **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science*, v. 239, n. 4839, p. 487-91, Jan 1988. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2448875>>.

SAKAMOTO, J. *et al.* **Etiological role of human papillomavirus infection in the development of penile cancer.** *Int J Infect Dis*, v. 78, p. 148-154, Jan 2019. ISSN 1878-3511. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30423461>>.

SALIT, I. E. *et al.* **Screening for HIV-associated anal cancer: correlation of HPV genotypes, p16, and E6 transcripts with anal pathology.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 18, n. 7, p. 1986-92, Jul 2009. ISSN 1538-7755. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19567510>>.

SARAIYA, M. *et al.* **US assessment of HPV types in cancers: implications for current and 9-valent HPV vaccines.** J Natl Cancer Inst, v. 107, n. 6, p. djv086, Jun 2015a. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25925419> >.

SCHIFFMAN, M. *et al.* **Carcinogenic human papillomavirus infection.** Nat Rev Dis Primers, v. 2, p. 16086, 12 2016. ISSN 2056-676X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27905473> >.

SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R.; MARKOWITZ, L. E. **Human papillomavirus vaccines.** In: Plotkin, S. A.; Orenstein, W.; Offit, P.A. (Orgs). Vaccines. Elsevier Saunders, p. 234-256, 2013.

SCHMELER, K. M.; STURGIS, E. M. **Expanding the benefits of HPV vaccination to boys and men.** Lancet, v. 387, n. 10030, p. 1798-9, Apr 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27203488> >.

SCHMITZ, M. *et al.* **Loss of gene function as a consequence of human papillomavirus DNA integration.** Int J Cancer, v. 131, n. 5, p. E593-602, Sep 2012. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22262398> >.

SEGONDY, M. *et al.* **Diagnostic value of human papillomavirus (HPV) 16 and HPV18 viral loads for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+) in a cohort of African women living with HIV.** J Clin Virol, v. 99-100, p. 79-83, 2018 Feb - Mar 2018. ISSN 1873-5967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29353074> >.

SENAPATI, R. *et al.* **HPV genotypes co-infections associated with cervical carcinoma: Special focus on phylogenetically related and non-vaccine targeted genotypes.** PLoS One, v. 12, n. 11, p. e0187844, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29161285> >.

SENKOMAGO, V. *et al.* **Higher HPV16 and HPV18 Penile Viral Loads Are Associated With Decreased Human Papillomavirus Clearance in Uncircumcised Kenyan Men.** Sex Transm Dis, v. 43, n. 9, p. 572-8, 09 2016. ISSN 1537-4521. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27513384> >.

SERRANO, B. *et al.* **Epidemiology and burden of HPV-related disease.** Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, v. 47, p. 14-26, Feb 2018. ISSN 1532-1932. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29037457> >.

SHABBIR, M. *et al.* **Glans resurfacing for the treatment of carcinoma in situ of the penis: surgical technique and outcomes.** Eur Urol, v. 59, n. 1, p. 142-7, Jan 2011. ISSN 1873-7560. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050658> >.

SHACTER, E.; WEITZMAN, S. A. **Chronic inflammation and cancer.** Oncology (Williston Park), v. 16, n. 2, p. 217-26, 229; discussion 230-2, Feb 2002. ISSN 0890-9091. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11866137> >.

SKERLEV, M. *et al.* **Human papillomavirus male genital infections: clinical variations and the significance of DNA typing.** Clin Dermatol, v. 20, n. 2, p. 173-8, 2002 Mar-Apr 2002. ISSN 0738-081X. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11973053> >.

SOHRABI, A. *et al.* **Is incidence of multiple HPV genotypes rising in genital infections?** J Infect Public Health, v. 10, n. 6, p. 730-733, 2017 Nov - Dec 2017. ISSN 1876-035X. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28215919> >.

SPIESS, P. E. *et al.* **Pathophysiological basis of human papillomavirus in penile cancer: Key to prevention and delivery of more effective therapies.** CA Cancer J Clin, Jun 2016. ISSN 1542-4863. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27314890> >.

ST DENIS, T. G. *et al.* **Combination approaches to potentiate immune response after photodynamic therapy for cancer.** Photochem Photobiol Sci, v. 10, n. 5, p. 792-801, May 2011. ISSN 1474-9092. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479313> >. *apud* MANJUNATH, A. *et al.* **Topical Therapy for non-invasive penile cancer (Tis)-updated results and toxicity.** Transl Androl Urol, v. 6, n. 5, p. 803-808, Oct 2017. ISSN 2223-4691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29184776> >.

STANLEY, M.; PINTO, L. A.; TRIMBLE, C. **Human papillomavirus vaccines--immune responses.** Vaccine, v. 30 Suppl 5, p. F83-7, Nov 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199968> >.

STERN, P. L. *et al.* **Therapy of human papillomavirus-related disease.** Vaccine, v. 30 Suppl 5, p. F71-82, Nov 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199967> >.

STUBENRAUCH, F.; LAIMINS, L. A. **Human papillomavirus life cycle: active and latent phases**. *Semin Cancer Biol*, v. 9, n. 6, p. 379-86, Dec 1999. ISSN 1044-579X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712884> >.

SUDENGA, S. L. *et al.* **Genital Human Papillomavirus Infection Progression to External Genital Lesions: The HIM Study**. *Eur Urol*, v. 69, n. 1, p. 166-73, Jan 2016. ISSN 1873-7560. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26051441> >.

SYRJÄNEN, S. **Human papillomavirus infections and oral tumors**. *Med Microbiol Immunol*, v. 192, n. 3, p. 123-8, Aug 2003. ISSN 0300-8584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12920585> >.

SZOSTEK, S. *et al.* **HPV16 E6 polymorphism and physical state of viral genome in relation to the risk of cervical cancer in women from the south of Poland**. *Acta Biochim Pol*, v. 64, n. 1, p. 143-149, 2017. ISSN 1734-154X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27801430> >.

TAYLOR, S. *et al.* **The incidence, clearance and persistence of non-cervical human papillomavirus infections: a systematic review of the literature**. *BMC Infect Dis*, v. 16, p. 293, 06 2016. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27301867> >.

THOMSEN, L. T. *et al.* **Long-term risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse according to high-risk human papillomavirus genotype and semi-quantitative viral load among 33,288 women with normal cervical cytology**. *Int J Cancer*, v. 137, n. 1, p. 193-203, Jul 2015. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25471319> >.

TOBIAN, A. A. *et al.* **Human papillomavirus incidence and clearance among HIV-positive and HIV-negative men in sub-Saharan Africa**. *AIDS*, v. 26, n. 12, p. 1555-65, Jul 2012. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22441255> >.

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.

TORNESELLO, M.L. *et al.* **Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer**. *Biomed. Res. Int.* 2013, 519619. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/519619>. (Epub 2014/01/03. PubMed PMID: 24383054; PubMed Central PMCID: PMC3872027).

TSAKOGIANNIS, D. *et al.* **Sites of disruption within E1 and E2 genes of HPV16 and association with cervical dysplasia.** J Med Virol, v. 87, n. 11, p. 1973-80, Nov 2015. ISSN 1096-9071. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25959607> >.

UTAIPAT, U. *et al.* **Association of cytologic grade of anal "Pap" smears with viral loads of human papillomavirus types 16, 18, and 52 detected in the same specimens from men who have sex with men.** J Clin Virol, v. 85, p. 48-55, 12 2016. ISSN 1873-5967. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27835758> >.

VACCARELLA, S. *et al.* **Clustering of human papillomavirus (HPV) types in the male genital tract: the HPV in men (HIM) study.** J Infect Dis, v. 204, n. 10, p. 1500-4, Nov 2011. ISSN 1537-6613. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908729> >.

VAN DER WEELE, P.; MEIJER, C. J. L. M.; KING, A. J. **Whole-Genome Sequencing and Variant Analysis of Human Papillomavirus 16 Infections.** J Virol, v. 91, n. 19, 10 2017. ISSN 1098-5514. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28701400> >.

VEMULA, S. V. *et al.* **HIV-1 induced nuclear factor I-B (NF-IB) expression negatively regulates HIV-1 replication through interaction with the long terminal repeat region.** Viruses, v. 7, n. 2, p. 543-58, Feb 2015. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25664610> >.

VIENS, L. J. *et al.* **Human Papillomavirus-Associated Cancers - United States, 2008-2012.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep, v. 65, n. 26, p. 661-6, Jul 2016. ISSN 1545-861X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27387669> >.

VYAS, N. S. *et al.* **Role of histological findings and pathologic diagnosis for detection of human papillomavirus infection in men.** J Med Virol, v. 87, n. 10, p. 1777-87, Oct 2015. ISSN 1096-9071. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25945468> >.

WALBOOMERS, J. M. *et al.* **Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.** J Pathol, v. 189, n. 1, p. 12-9, Sep 1999. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10451482> >.

WANG-JOHANNING, F. *et al.* **Quantitation of human papillomavirus 16 e6 and e7 dna and rna in residual material from thinprep papanicolaou tests using**

realtime polymerase chain reaction analysis. *Cancer*, v. 94, n. 8, p. 2199-2210, 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12001118>>.

WENTZENSEN, N. *et al.* **Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state-of-the-science.** *Gynecol Oncol*, v. 112, n. 2, p. 293-9, Feb 2009. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19054549> >.

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 Dis*, v. 199, n. 7, p. 936-44, Apr 2009. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236277> >.

WHELAN, J. A.; RUSSELL, N. B.; WHELAN, M. A. **A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR.** *J Immunol Methods*, v. 278, n. 1-2, p. 261-9, Jul 2003. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12957413> >.

WIELAND, U.; KREUTER, A. **[Genital warts in HIV-infected individuals].** *Hautarzt*, v. 68, n. 3, p. 192-198, Mar 2017. ISSN 1432-1173. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28160045>>.

WIELAND, U. *et al.* **Communication: papillomavirus DNA in basal cell carcinomas of immunocompetent patients: an accidental association?** *J Invest Dermatol*, v. 115, n. 1, p. 124-8, Jul 2000. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10886519> >.

WINDER, D. M. *et al.* **Sensitive HPV detection in oropharyngeal cancers.** *BMC Cancer*, v. 9, p. 440, Dec 2009. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003490> >.

WRIGHT, D.K. & MANOS, M.M. - Sample preparation from paraffin-embedded tissue
In: INNIS, M.A. **PCR protocols: a guide to methods and applications.** Berkeley, Academic Press, 1990. p. 153-158.

WU, Z. *et al.* **Association between human papillomavirus (HPV) 16, HPV18, and other HR-HPV viral load and the histological classification of cervical lesions: Results from a large-scale cross-sectional study.** *J Med Virol*, v. 89, n. 3, p. 535-541, 03 2017. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27464021> >.

XI, L. F. *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 Prev*, v. 18, n. 9, p. 2507-12, Sep 2009. ISSN 1538-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19690188> >.

XU, F. *et al.* **Integration of the full-length HPV16 genome in cervical cancer and Caski and Siha cell lines and the possible ways of HPV integration.** *Virus Genes*, v. 50, n. 2, p. 210-20, Apr 2015. ISSN 1572-994X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25823917> >.

YAMAGUCHI, A. *et al.* **Detection of human papillomavirus DNA by PCR/microfluometry for screening of cervical cancer.** *Clinica Chimica Acta*, v. 318, p. 41-49, 2002.

YAMASHITA, Y. *et al.* **Staging and prognosis of oropharyngeal carcinoma according to the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual in human papillomavirus infection.** *Eur Arch Otorhinolaryngol*, Dec 2018. ISSN 1434-4726. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30594962> >.

YUAN, J. *et al.* **Genital warts treatment: Beyond imiquimod.** *Hum Vaccin Immunother*, v. 14, n. 7, p. 1815-1819, 07 2018. ISSN 2164-554X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29505317> >.

ZARDO, G. P. *et al.* **[Vaccines as an agent for immunization against HPV].** *Cien Saude Colet*, v. 19, n. 9, p. 3799-808, Sep 2014. ISSN 1678-4561. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25184585> >.

ZEIER, M. D. *et al.* **Combination antiretroviral therapy reduces the detection risk of cervical human papilloma virus infection in women living with HIV.** *AIDS*, v. 29, n. 1, p. 59-66, Jan 2015. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25387313> >.

ZHANG, R. *et al.* **Dysregulation of host cellular genes targeted by human papillomavirus (HPV) integration contributes to HPV-related cervical carcinogenesis.** *Int J Cancer*, v. 138, n. 5, p. 1163-74, Mar 2016a. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26417997> >.

ZREIK, A. *et al.* **Carbon dioxide laser treatment of penile intraepithelial neoplasia.** *Surgeon*, v. 15, n. 6, p. 321-324, Dec 2017. ISSN 1479-666X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27964825> >.

ANEXO A - CARTA CONVITE PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PESQUISA

Belo Horizonte, <dia> de <mês> de <ano>.

Prezado,

Convidamos o Laboratório sob sua gestão, a participar de um estudo que será desenvolvido na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais que tem por finalidade estudar amostras de condiloma acuminado e câncer penianos provocados pela infecção por Papilomavírus Humano.

O condiloma acuminado é a lesão mais frequente na população masculina, entretanto, apesar de benigna, encontra-se frequentemente relacionada à coinfeção com HPVs de alto risco estando assim associada ao aumento do risco de se desenvolver o câncer.

Lesões neoplásicas penianas são pouco frequentes e seu diagnóstico é difícil. Ainda não existem métodos para rastreamento destas lesões, sendo o diagnóstico difícil e tardio, levando a tratamentos agressivos, com alta probabilidade de amputação do membro.

O diagnóstico preciso e precoce de lesões provocadas pelo HPV possibilita uma rápida intervenção, garante tratamentos adequados e menos agressivos, possibilitando também a estratificação do risco de evolução para câncer e o acompanhamento do paciente mais grave.

A carga viral, a avaliação do estado físico do DNA-HPV, a quantificação da expressão das oncoproteínas virais e a avaliação de biomarcadores imuno-histoquímicos têm sido algumas das estratégias estudadas para o diagnóstico precoce de lesões neoplásicas, sendo a maioria dos trabalhos relacionados à população feminina. A escassez de informações da infecção pelo HPV na população masculina dificulta a compreensão de suas manifestações clínicas nesse segmento.

Portanto, este trabalho tem como proposta caracterizar amostras de condiloma acuminado peniano quanto à expressão imuno-histoquímica de p16INK4a, MCM7, RAP1A e Ki-67, avaliar a carga viral dos vírus HPV-6, HPV-11 e HPV-16 e o estado físico do DNA-HPV-16 e correlacionar os dados moleculares encontrados com a presença de lesões neoplásicas de alto grau associadas. Os dados obtidos nas

amostras de condiloma acuminado também serão comparados aos das amostras de câncer peniano.

O laboratório, portanto, participaria da pesquisa no fornecimento de amostras parafinadas de condiloma acuminado e câncer penianos e com o resultado histopatológico destas. Todos os trabalhos científicos produzidos a partir desta pesquisa terão o nome do laboratório citado.

A análise de múltiplos marcadores pode melhorar o entendimento sobre o desenvolvimento das neoplasias penianas assim como acrescentar informações sobre o papel das múltiplas infecções no desenvolvimento destas lesões. Talvez, o emprego destes biomarcadores em conjunto possa possibilitar a identificação precoce dos pacientes em risco de evolução para o câncer. O tratamento da doença em sua fase inicial, reduziria a agressividade do tratamento, seus gastos, além de colaborar para uma redução significativa nas taxas de incidência e de mortalidade causada por este tumor.

Agradeço sua atenção.

Maria Gabrielle de Lima Rocha

Professora Adjunto

Faculdade de Farmácia

Universidade Federal de Minas Gerais

ANEXO B - CARTA DE ACEITE PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PESQUISA

Belo Horizonte, <dia> de <mês> de <ano>.

O <nome da empresa>, após análise do projeto apresentado, intitulado: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS E DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM AMOSTRAS DE CONDILOMA ACUMINADO, manifesta interesse em participar deste estudo que será desenvolvido na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Declaramos, para os devidos fins, que concordamos em disponibilizar aos pesquisadores deste estudo, para o desenvolvimento das atividades referentes ao Projeto de Pesquisa, amostras parafinadas de condiloma acuminado e câncer penianos, disponíveis no arquivo do laboratório, com o resultado histopatológico destas.

(Nome e assinatura do responsável pela empresa)

ANEXO C – Carta de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS E DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM AMOSTRAS DE CONDILOMA ACUMINADO

Pesquisador: Maria Gabrielle de Lima Rocha

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 73908117.9.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.334.721

Apresentação do Projeto:

Este estudo retrospectivo utilizará amostras parafinadas de condiloma acuminado e de câncer peniano de pacientes que foram submetidos à remoção cirúrgica. Estas amostras serão adquiridas nos diversos laboratórios de Anatomia Patológica em Belo Horizonte. Os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes doadores das amostras de condiloma acuminado e câncer peniano parafinadas serão restritos, consistindo apenas do diagnóstico laboratorial da lesão e idade do paciente. Este trabalho busca avaliar a presença de lesões intraepiteliais de alto grau em amostras de condiloma acuminado, infectadas unicamente pelos vírus 6 e/ou 11 ou em coinfeção com o HPV-16, e correlacionar a existência destas lesões com a carga viral destes vírus, com o estado físico do HPV-16 e também com a expressão das oncoproteínas p16INK4a, MCM7, RAP1A e Ki-67. Estes biomarcadores foram escolhidos para estudo por se considerar que o carcinoma peniano HPV-dependente pode apresentar parâmetros etiológicos e epidemiológicos similares ao do colo uterino (KALANTARI et al., 2008). Estudos em mulheres associaram a presença de altas cargas virais à persistência de infecção e ao desenvolvimento de lesões. A integração viral está fortemente associada ao agravamento das lesões e as oncoproteínas escolhidas para este estudo foram apontadas como possíveis biomarcadores de progressão de lesão. Este estudo pretende

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 2.334.721

desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_973203.pdf	18/08/2017 15:59:08		Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	18/08/2017 15:58:33	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.doc	16/08/2017 18:06:38	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	Parecer4.jpg	16/08/2017 17:44:18	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	Parecer3.jpg	16/08/2017 17:43:49	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	Parecer2.jpg	16/08/2017 17:43:28	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	Parecer1.jpg	16/08/2017 17:43:06	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	CartaConvite.docx	16/08/2017 17:39:20	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	16/08/2017 17:38:22	Maria Gabrielle de Lima Rocha	Aceito
Outros	73908117parecerassinado.pdf	18/10/2017 10:48:16	Vivian Resende	Aceito
Outros	73908117aprovacaoassinar.pdf	18/10/2017 10:48:28	Vivian Resende	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br